

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA

E. A. P. DE MEDICINA HUMANA

**“Histomorfometría de la capa granular orbitofrontal
murina sometida a administración crónica de bebidas
alcohólicas adulteradas”**

TESIS

Para optar el título Profesional de Médico Cirujano

AUTOR

José Rafael Díaz Rudas

ASESOR

José Ernesto Ráez González

Lima-Perú

2015



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE MEDICINA



ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE MEDICINA HUMANA

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO
PROFESIONAL DE MÉDICO CIRUJANO**

Siendo las 14:30 horas del día diecisiete de marzo del año dos mil quince, en el Aula 2C del Pabellón de aulas de la Facultad de Medicina, en cumplimiento de lo señalado en el inciso "c" del Art. 66 del Estatuto de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (**R.R. 78337-84**), se reunió el Jurado integrado por los Doctores: Emilio Cristóbal Blanco Blasco (Presidente), José Segundo Niño Montero (Miembro) y David Díaz Leyva (Miembro).

Se realizó la exposición de la tesis titulada "**HISTOMORFOMETRIA DE LA CAPA GRANULAR ORBITOFRONTAL MURINA SOMETIDA A ADMINISTRACION CRONICA DE BEBIDAS ALCOHOLICAS ADULTERADAS**", presentado por el Bachiller en Medicina **José Rafael Díaz Rudas**, para optar el Título Profesional de Médico Cirujano, habiendo obtenido el calificativo de..... **VEINTE** (20).

Dr. Emilio Cristóbal Blanco Blasco
Presidente

Dr. José Segundo Niño Montero
Miembro

Dr. David Díaz Leyva
Miembro





Esta tesis va dedicada a mi mamá, la Sra. Lucía Rudas Sánchez y a mi familia en general. Un agradecimiento especial al Dr. Ernesto Ráez, Dra. Adriana Ciudad, Dra. Diana Rivas, Sra. María Guevara y Licenciada Frecia Astocóndor del ICN y en general a todas aquellas personas que me brindaron su apoyo incondicional para la realización de esta tesis, un eterno agradecimiento a todo ellos.

ÍNDICE

CAPÍTULO 1: INTRODUCCION **p. 01**

- 1.1 – Planteamiento del problema
 - 1.1.1 – Descripción del problema
 - 1.1.2 – Antecedentes del problema y fundamentación científica
- 1.2 – Justificación e importancia del problema
- 1.3 – Formulación del problema
- 1.4 – Hipótesis
- 1.5 – Objetivos de la Investigación
 - 1.5.1 – Objetivo General
 - 1.5.2 – Objetivos específicos

CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA **p. 14**

- 2.1 – Tipo de estudio
- 2.2 - Diseño de la investigación
- 2.3 – Muestra del estudio
- 2.4 – Técnica y método del trabajo
- 2.5 – Procesamiento y análisis de los datos
- 2.6 – Definición y operacionalización de variables

CAPÍTULO 3: ANÁLISIS DE DATOS **p. 36**

- 3.1 – Resultados
- 3.2 – Discusión
- 3.3 – Conclusiones
- 3.4 – Recomendaciones

CAPÍTULO 4: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

p. 63

4.1 – Referencias bibliográficas

CAPÍTULO 5: ANEXOS

p. 65

Histomorfometría de la capa granular orbitofrontal murina sometida a administración crónica de bebidas alcohólicas adulteradas

AUTOR

José Rafael Díaz Rudas

Alumno de Pre grado de la Facultad de Medicina. UNMSM.

RESUMEN

OBJETIVO GENERAL: Determinar las alteraciones histomorfométricas de la capa granular de la corteza orbitofrontal de *Rattus norvegicus*, a nivel de las neuronas granulares y glías de la serie astrocítica sometidas a administración crónica de bebidas alcohólicas adulteradas.

MATERIAL Y MÉTODOS: Estudio experimental, prospectivo, comparativo y longitudinal. Se utilizaron cuarenta y cinco ratas de laboratorio *Rattus norvegicus*, variedad albina, obtenidos de los bioterios del CENAN y trasladados al bioterio de la Facultad de Medicina Humana de la UNMSM. Fueron divididos en 3 grupos de trabajo: el grupo control (Grupo O) y los grupos experimentales (Grupo A y Grupo B), el Grupo A recibió la bebida alcohólica denominada “Tumbaloco” (mezcla de pisco, anisado y cognac adulterado) y el Grupo B la bebida alcohólica denominada “Penal” (mezcla de pisco, anisado y cognac adulterado más cerveza). Se enviaron dichas bebidas alcohólicas al Centro de Información, Control Toxicológico y Apoyo a la Gestión Ambiental (CICOTOX) para el análisis cuantitativo de etanol y metanol por el método de espectrofotometría de absorción atómica. Se les administró de manera crónica, por un tiempo de 12 semanas, bebidas alcohólicas adulteradas al grupo experimental y agua al grupo control mediante el uso de una sonda orogástrica. Luego de las 12 semanas se procedió al sacrificio del animal mediante la decapitación, se procedió a la extracción del encéfalo murino en un tiempo no mayor de 4 minutos luego del cual fue colocado en una

solución de formol neutro al 10%. Se hizo un corte coronal del encéfalo a nivel de la corteza prefrontal, una parte del tejido fue incluido en parafina para la realización de láminas histológicas con la coloración Hematoxilina & Eosina e inmunohistoquímica con GFAP (marcador específico para astrocitos) la otra parte del tejido fue llevada a congelación para la elaboración de láminas histológicas con la coloración Argéntica del Río Ortega impregnación simple. Dichas láminas histológicas fueron fotografiadas y posteriormente analizadas mediante el procesador de imágenes JMicrovision 1.2.5.

RESULTADOS: No existió diferencia estadísticamente significativa en el peso de los animales al inicio y al final del experimento. El área determinada por las neuronas necróticas de la capa granular fue menor en los grupos que recibieron bebidas alcohólicas adulteradas a predominio del grupo que recibió la bebida “Penal”. El mayor porcentaje de neuronas necróticas se observó en el grupo que recibió bebidas alcohólicas adulteradas más cerveza el cual fue estadísticamente superior que el grupo control, el porcentaje de neuronas necróticas en el grupo que recibió sólo bebidas alcohólicas adulteradas también fue estadísticamente superior que el grupo control pero menor que el grupo que recibió bebidas alcohólicas adulteradas más cerveza. Se observó gliosis de la serie astrocítica en los grupos que recibieron bebidas alcohólicas adulteradas también a predominio del grupo que recibió la bebida “Penal”.

CONCLUSIONES: El consumo crónico de bebidas alcohólicas adulteradas produce una disminución de las neuronas granulares y un aumento de las glías de la serie astrocítica a nivel de la capa granular de la corteza orbitofrontal. Las alteraciones fueron mayores en el grupo que recibió la bebida alcohólica “Penal”, mezcla de 3 bebidas alcohólicas adulteradas más cerveza.

PALABRAS CLAVE: Bebidas alcohólicas adulteradas, corteza orbitofrontal, muerte neuronal, gliosis.

Histomorphometry of the murine orbitofrontal granular layer under chronic administration of adulterated alcoholic beverages

AUTHOR

José Rafael Díaz Rudas

Pre-grade student of Medicine School UNMSM.

ABSTRACT

GENERAL OBJECTIVE: To determine the histomorphometric alterations of the orbitofrontal cortex granular layer of *Rattus norvegicus* at a granule neurons level and the glias of the astrocytic series under a chronic administration of adulterated alcoholic beverages.

MATERIAL AND METHODS: Experimental, prospective, comparative, longitudinal study. Forty five rats *Rattus norvegicus*, albino variety, obtained from the laboratory animal center of the CENAN and transferred to the laboratory animal center of the Medicine School UNMSM were used. They were divided into three working groups: the control group (Group A) and the experimental groups (Group A and Group B) Group A received the alcoholic beverage called "Tumbaloco" and Group B received the alcoholic beverage called "Penal". These alcoholic beverages were sent to the Center of Information Toxicologic Control and Support to the Environmental Management (CICOTOX) for quantitative analysis of ethanol and methanol by the Atomic absorption spectrophotometry method. The experimental group was administered chronically with the adulterated alcoholic beverages for a period of 12 weeks and the control group was administered with water for the same period of time by using an orogastric tube. After 12 weeks, the animals were sacrificed by decapitation and the

extraction of murine brain in a time not exceeding four minutes was performed. After extraction, the brain was placed in a solution of 10% neutral formalin. A coronal section of the brain was made at the level of the prefrontal cortex; one part of the tissue was embedded in paraffin for performing histological slides with the Hematoxylin & Eosin stain, the other part of the tissue was freezed for the development of histological slides with the Rio Ortega argentic coloration simple impregnation. These histological slides were photographed and then analyzed by the image processor JMicroVision 1.2.5.

RESULTS: There was no statistically significant difference in the weight of the animals at the beginning and the end of the experiment. The area determined by the living neurons in the granular layer was lower in the groups receiving adulterated alcoholic beverages, especially in the group receiving the beverage calles "Penal". The highest percentage of dead neurons was observed in the group that received adulterated alcoholic beverages and beer which was statistically higher than the control group. The percentage of dead neurons in the group that received only adulterated alcoholic beverages was also statistically higher than the control group but lower than the group receiving adulterated alcoholic beverages and beer. Gliosis of the astrocytic series was observed in the groups receiving adulterated alcoholic beverages also dominated by the group receiving the "Penal" beverage.

CONCLUSIONS: A chronic drinking of adulterated alcoholic beverages produce a decrease in granule neurons and increases the gliosis of the astrocytic series at the granular layer of the orbitofrontal cortex series. The alterations were higher in the group receiving the beverage called "Penal".

KEYWORDS: Adulterated alcoholic beverages, orbitofrontal cortex, neuronal death, gliosis.

Capítulo 1

Introducción

1.1 - PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1.1 - DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

En nuestro país, el alcoholismo es un problema de salud pública, por la causa de morbi-mortalidad que produce. Las bebidas alcohólicas que se consumen son distintas tanto en la costa, sierra o selva, habiendo una clara preferencia por las bebidas alcohólicas adulteradas sobre todo en las zonas urbano-marginales de las grandes ciudades. Dicha preferencia se explica por la pobreza extrema en la que se encuentran inmersos aquellos sectores de nuestra población, los que se ven atraídos por el bajo costo de dichas bebidas y la fácil accesibilidad a las mismas.

Se ha estudiado mucho sobre los daños que las bebidas alcohólicas, o mejor dicho, que el etanol produce en el organismo. Estudios sobre alcoholismo mencionan que los daños son sistémicos, teniendo predilección por el sistema nervioso, tanto en la fase aguda como crónica de la enfermedad. Pero poco o nada se ha escrito sobre el consumo de las bebidas alcohólicas adulteradas, bebidas propias de nuestro país, sea por la pobreza extrema que envuelve a un gran sector de la población como por la ineficacia de las autoridades en la erradicación de la fabricación de dichas bebidas. Se piensa que los daños de este tipo de bebidas alcohólicas se deben al alto contenido de etanol y/o metanol que pudieran estar presentes en su composición, no habiéndose realizado estudios concluyentes al respecto. Se menciona así mismo un marcado deterioro neurológico de las personas que los consumen de manera crónica, valiéndose para tal afirmación de trabajos realizados en otros países con realidades totalmente distintas a las nuestras, en donde se hallan

alteraciones histológicas del sistema nervioso debidas al consumo de bebidas alcohólicas reglamentadas, las que tienen un contenido de alcoholes ya estandarizados.

El alcoholismo crónico produce dependencia y alteraciones de la conducta, los cuales se explican actualmente por los daños que ocasionan en la corteza frontal cerebral a nivel de las neuronas y glías de la serie astrocítica. Las bebidas alcohólicas adulteradas no quedarían ajenas a producir dichas alteraciones, alteraciones que se deberían al contenido de etanol de las mismas.

Se plantea la necesidad de realizar estudios histopatológicos y corroborar tal suposición. Pero no se pueden realizar dichos estudios en seres humanos, por los graves daños a la salud que ocasionarían en las personas expuestas a dichas bebidas alcohólicas adulteradas. Tampoco podríamos realizar dichos estudios histopatológicos en aquellos que ya lo consumen de manera crónica, pues la única forma de hacerlo sería practicándoseles una biopsia cerebral a nivel de la corteza frontal, procedimientos sumamente peligrosos, pudiendo ocasionar daños graves a la salud como secuelas e incluso la muerte. Menos practicándoles una necropsia mucho tiempo después de morir pues los cambios anatomopatológicos que veríamos serían macroscópica y no microscópica (histopatológicos) que es lo que se espera observar, ya que las alteraciones histopatológicas que se encontrarían podrían muy bien ser explicados por hipoxia más que por el consumo crónico de bebidas alcohólicas adulteradas.

Por los motivos antes descritos se plantea realizar dichos estudios en animales de laboratorio, siendo las ratas de laboratorio el animal de elección para estudios experimentales en neuropatología, para luego extrapolar las alteraciones histopatológicas a humanos.

1.1.2 - ANTECEDENTES DEL PROBLEMA Y FUNDAMENTACION CIENTÍFICA

Desde que el hombre aprendió a hacer uso del proceso de fermentación elabora bebidas alcohólicas, por ello el consumo de alcohol va íntimamente unido a las costumbres de casi todas las civilizaciones. Etimológicamente la palabra alcohol procede del árabe “al kohl” que significa literalmente el colirio, un polvo finísimo; se pensaba que los efectos consiguientes a la ingesta del vino eran debidas a la inhalación de un polvo impalpable ⁽¹⁾.

El Comité de Expertos de Farmacodependencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha realizado en distintas ediciones (1951, 1964, 1974, 1975, 1981) un esfuerzo para señalar las características comunes de las drogas capaces de generar dependencia y su clasificación. Finalmente dicho Comité de Expertos realizó en 1981 un memorándum en el que sustituye el término de Alcoholismo por el de Síndrome de Dependencia al Alcohol o Dependencia Alcohólica. La OMS define al Síndrome de Dependencia al alcohol como: “...el estado psíquico y usualmente también físico, resultado del consumo del alcohol, caracterizado por respuestas conductuales y de otro tipo que siempre incluyen la compulsión para consumir alcohol en forma continua o periódica con objeto de experimentar sus efectos psíquicos y en ocasiones para evitar las molestias de su ausencia; la tolerancia puede estar o no presente...”

En el Perú pre hispano la única bebida alcohólica era la chicha fermentada de maíz, que aún es de consumo tradicional de las poblaciones nativas, su uso fue de tipo ceremonial. El consumo era moderado, salvo en rituales religiosos al culto solar y cultivo de la tierra en donde estaba permitido el consumo excesivo. La conquista española y la pérdida de los controles sociales eficaces conllevaron a que numerosas colectividades nativas se entregaran con exceso a la bebida. Se introdujeron la vid y luego la caña de azúcar, destilando la caña de azúcar se obtuvo el aguardiente, que en el siglo pasado fue la bebida representativa del Perú indígena y rural. En el Perú actual, en la costa se consume cerveza, aguardiente de caña y de uva, el pisco y el vino; en la

ciudad se usa whisky, cognac, ginebra, vodka, etc. En la sierra se usa el huarapo y el cañazo, también la cerveza. En la selva, la bebida fermentada de yuca o masato, la cerveza, vino de uva y caña. Estudios de prevalencia sobre dependencia alcohólica en el Perú indican que el consumo va de 3 a 14,8% (20% en obreros). La relación hombre–mujer (4 a 1 y 16 a 1), siendo el consumo per cápita de 6 a 7 litros⁽²⁾. El más fuerte es el consumo intermitente y los de mayor riesgo son de clase económica baja y educativas pobres. Habiendo una clara preferencia por las bebidas alcohólicas adulteradas sobre todo en las zonas urbano–marginales de las grandes ciudades, dicha preferencia se explica por la pobreza extrema en que se encuentran inmersos aquellos sectores de nuestra población, los que se ven atraídos por el bajo costo de las mismas y su fácil accesibilidad.

En el Cercado de Lima en la zona denominada “La Huerta Perdida”, en Barrios Altos, zona en la que antiguamente existía una gran huerta bajo los cuidados de la hermanas del Convento del Padre Mogrovejo, existe hoy una gran cantidad de establecimientos que venden al libre albedrío bebidas alcohólicas a un muy bajo costo y sin registro sanitario. Lugares en los que podemos encontrar la venta de Pisco, Cognac y Anisado adulterados, a la módica suma de un nuevo sol. Los lugareños las mezclan y les dan ciertos nombres a sus preparados: “Racumín” (Pisco adulterado + 1 sobre de jugo de naranja azucarado), “Tumbaloco” (partes iguales de Pisco adulterado + Cognac adulterado + Anisado adulterado), “Penal” (partes iguales de Pisco adulterado + Cognac adulterado + Anisado adulterado + cerveza).

En cuanto al alcohol y su metabolismo humano el etanol se metaboliza fundamentalmente por oxidación, transformándose en acetaldehído. En las situaciones de consumo oral, las más habituales, este proceso acontece principalmente en el hígado y se halla fundamentalmente mediado por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH). Esta enzima cataliza la conversión reversible de los alcoholes a sus correspondientes aldehídos y cetonas utilizando Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido (NAD) como cofactor. Existen también otros dos sistemas enzimáticos hepáticos que posibilitan esta

misma reacción y que adquieren relevancia ante niveles muy elevados de alcohol o alguna deficiencia en el sistema principal. Estos dos sistemas son el llamado Sistema Microsomal Oxidativo del Etanol (MEOS) y el mediado por el complejo catalasa-peróxido de hidrógeno. En un segundo paso el acetaldehído producido es metabolizado a acetato principalmente por la Aldehído Deshidrogenasa Hepática (ALDH). Así mismo, existen indicios claros de la existencia de un metabolismo oxidativo extrahepático del etanol en diferentes órganos corporales tales como el corazón, el estómago, los riñones y el cerebro. Este metabolismo está mediado por uno o más de los sistemas enzimáticos localizados en el hígado, aunque la predominancia entre ellos en cada tejido está aún en fase de estudio, así como lo está también, la significación funcional de dicho metabolismo. No obstante, el acetaldehído no es el único metabolito que puede formarse después del consumo de etanol. El acetaldehído se metaboliza fundamentalmente en la mitocondria, al contrario que el etanol, cuyo metabolismo hepático es esencialmente citosólico ⁽³⁾.

La oxidación del etanol en humanos y otros animales se da en dos etapas y acontece principalmente en el hígado. A pesar de ello, existe la posibilidad de que, junto al periférico, exista un metabolismo cerebral del etanol. Esta posibilidad queda sustentada por la demostración de la existencia, en el Sistema Nervioso Central (SNC), de diferentes sistemas enzimáticos capaces de metabolizar el etanol. En el caso del cerebro el mapa enzimático es menos conocido que en el hígado y parece ser un tanto diferente. Así, la ADH clase I, que en el hígado es el principal oxidante del etanol a concentraciones bajas y moderadas, posee una muy limitada actuación en el SNC. Hasta el momento, no se ha podido demostrar la presencia de la isoforma I de ADH en cerebro. Fundamentalmente, en el cerebro de humanos y también en el de ratones, la isoforma más abundante de esta enzima es la clase III. Sin embargo, esta isoforma tiene baja afinidad por el etanol y difícilmente es activada por éste; ya que aún en severas intoxicaciones etílicas, no se alcanzan las concentraciones necesarias para que su contribución sea relevante. También se ha descrito la presencia de citocromos pertenecientes al

complejo enzimático MEOS, y en concreto, se ha demostrado que son inducidos por el etanol como ocurría en el hígado. La presencia e inducción de esta enzima microsomal en el cerebro reviste mucha importancia. Se sabe que la distribución cerebral de citocromos pertenecientes al complejo enzimático MEOS en humanos no es uniforme; concentrándose sobre todo en neuronas del córtex cerebral, células de Purkinje y granulares del cerebelo, el giro dentado y el hipocampo. De esta forma, aunque solamente cantidades muy pequeñas de alcohol sean oxidadas en el cerebro, la generación local de acetaldehído puede tener importantes consecuencias funcionales. Por ejemplo, esta inducción ha sido asociada con la aceleración de la lipoperoxidación y posiblemente con los efectos tóxicos del etanol y la alteración de las membranas neurales. Finalmente, existe un gran número de pruebas de que el sistema catalasa-peróxido de hidrógeno se halla presente y activo en el SNC. Algunas investigaciones han presentado pruebas indirectas de la oxidación de etanol a acetaldehído en el cerebro de rata, vía el sistema enzimático catalasa + peróxido de hidrógeno. Estudios inmunohistoquímicos han puesto de relieve que la catalasa se sitúa fundamentalmente en los cuerpos de neuronas catecolaminérgicas del tronco encefálico y también en ciertos tipos de glía de las mencionadas áreas, por tanto el número total de células neurales con alta concentración de catalasa (a los mismos niveles que en los hepatocitos) es muy pequeña en relación al total del cerebro. Sin embargo, tomados en su conjunto, estos datos sugieren que aunque la cantidad total de acetaldehído que pueda producirse en el encéfalo a través de la catalasa sea pequeña, existe la posibilidad de que se produzcan acumulaciones de acetaldehído suficientes para provocar cambios en la fisiología y la actividad de determinados grupos neuronales.

Además del metabolismo oxidativo enzimático, también existen vías de metabolismo de etanol no oxidativas que se producen a través de la formación de ésteres etílicos de los ácidos grasos. Los ésteres etílicos son metabolitos no oxidativos del etanol que se pueden formar *in vivo* mediante una reacción catalizada por la enzima etil ester sintetasa. Los efectos fisiológicos de la formación de ésteres etílicos consisten en la afectación de la capacidad

oxidativa de la mitocondria, aunque también se ha descrito su capacidad para desordenar las membranas celulares. Estos metabolitos parecen tener una especial relevancia para el daño tisular cerebral originado por el consumo crónico de cantidades abundantes de etanol. El fosfatidiletanol es sintetizado por la reacción del etanol con la fosfatidilcolina catalizada por el enzima fosfolipasa D. La formación de este compuesto se ha demostrado en células sanguíneas humanas y cerebro de rata.

Ya que se ha observado que la formación de este compuesto es mayor en alcohólicos que en sujetos normales, se ha sugerido que la formación de fosfatidiletanol pudiera considerarse como un marcador de la propensión al alcoholismo. Actualmente, se desconocen las consecuencias funcionales de la formación de fosfatidiletanol, no obstante, se ha demostrado que dicha formación aumenta la tolerancia de la membrana celular a los efectos desorganizadores del etanol. En los últimos años se han descrito algunos efectos derivados de la exposición del tejido cerebral al acetaldehído, *in vitro* e *in vivo* que refuerzan la idea de que este producto pudiera mediar algunos de los efectos psicofarmacológicos del etanol, en tanto que vinculan esta sustancia a efectos y estructuras neurales implicadas en el mecanismo de acción de otras drogas de abuso.

El abuso crónico del etanol produce a largos plazos dependencia física en cuya base neurobioquímica existen falsos neurotransmisores correlacionados con el sistema endorfinérgico. El acetaldehído resulta ser varias veces más tóxico y potente que el propio etanol en virtud de ser más reactivo y liposoluble. De esta forma en el efecto tóxico-necrótico de las bebidas alcohólicas no solo influiría el propio etanol, sino fundamentalmente el acetaldehído. El mecanismo de acción del etanol y su metabolito principal resulta ser polifuncional y multifocal así encontramos por ejemplo un aumento en la fluidez de las membranas neuronales con aumento del colesterol en la mismas y manifiesta alteración en la biofísica, por lo tanto alteraciones técnicas del potencial de membrana. También se constata un consumo excesivo de Nicotin Adenin Dinucleótido (NAD) importante

cofactor de las reacciones metabólicas intracelulares con aumento consiguiente de su forma hidrogenada, lo que inhibe la vía oxidativa de los aldehídos y un indirecto efecto de potenciación del efecto tóxico. En la tolerancia a la administración crónica de alcohol se encuentra una alteración en la permeabilidad sináptica con aumento de los iones Na, K, Ca.

El alcoholismo produce cambios de la personalidad y conducta, negligencia personal y social, confabulación. Dichos síntomas podrían incrementar el riesgo a exponerse a actos violentos y actividades criminales ⁽⁴⁾. Las bases estructuradas para aquellos síntomas del lóbulo frontal que se observa en personas alcohólicas se ven fundamentalmente en los cambios de la corteza frontal y disminución de la sinapsis cortical a nivel frontal. No habiendo sido descrito anteriormente, los cambios corticales son similares a los hallados en la demencia frontotemporal, lo que explicaría la sintomatología frontal alcohólica. El alcoholismo produce cambios de la personalidad y conducta ⁽⁵⁾.

Desde el punto de vista anatomopatológico los efectos de la ingesta de alcohol sobre el sistema nervioso, son múltiples pues, además del efecto tóxico directo que el etanol tiene sobre el sistema nervioso, en el alcoholismo crónico se asocian con gran frecuencia otros procesos que en definitiva, son los causantes de los trastornos neurológicos más comunes asociados a esta adicción, así como una mayor incidencia de diversas enfermedades neurológicas. Así, en el alcoholismo encontramos: Deficiencias nutricionales. Afectación de órganos cuya patología repercute secundariamente sobre el sistema nervioso (cirrosis hepática fundamentalmente). Posible existencia de tóxicos contaminantes en las bebidas alcohólicas. Alta incidencia de traumatismos craneales, a veces no bien documentados, que provocan hematomas subdurales; de hecho, el 50% de ellos está asociado al alcoholismo. Mayor frecuencia de hemorragias subaracnoideas e intraparenquimatosas, en general de tipo lobar, cuyo riesgo aumenta en relación directa con la cantidad de etanol ingerida. Si bien el consumo leve de alcohol parece disminuir la incidencia de accidente vascular cerebral, el consumo severo aumenta hasta 2,5 veces el riesgo de padecerlo. Mayor incidencia de procesos infecciosos. La intoxicación alcohólica aguda produce

grado variable de estimulación del sistema nervioso (regocijo, excitación, desinhibición, locuacidad, agresividad, irritabilidad, descoordinación), pero si es intensa, puede seguirse de una fase depresiva (somnolencia, estupor) que puede conducir a coma y, en casos severos, a muerte por depresión cardio-respiratoria. En estos casos la autopsia muestra congestión, edemas y hemorragias petequiales difusas. De forma ocasional pueden encontrarse hemorragia o infarto masivos, usualmente en el contexto de hipertensión arterial o arteriosclerosis preexistentes ⁽⁶⁾.

La encefalopatía de Wernicke (EW) está producida por la deficiencia de tiamina (vitamina B₁), vitamina hidrosoluble y termolábil que no se sintetiza en hígado y que se almacena sólo en pequeñas cantidades en el organismo, por lo que es importante la ingesta continua de alimentos que la contengan. Wernicke describió este síndrome en tres enfermos, dos alcohólicos y una joven con estenosis pilórica por ingestión de ácido sulfúrico. Estos casos reflejan los grupos de riesgo más importantes en occidente: alcoholismo crónico y malnutrición severa secundaria a trastornos gastrointestinales. La EW debe considerarse como una urgencia clínica, ya que el retraso en el tratamiento con tiamina en las fases iniciales puede hacer que este proceso, esencialmente reversible, se transforme en un cuadro patológico irreversible. El término Psicosis de Korsakoff (SK) se refiere a un síndrome amnésico, que suele cursar junto con la EW. Las alteraciones neuropatológicas de la EW varían según el estadio y la severidad del proceso. Los cuerpos mamilares están afectados prácticamente siempre, pero en los casos más severos hay también lesiones en estructuras cercanas a las paredes del tercer ventrículo (hipotálamo, región periventricular del tálamo), sustancia gris periacueductal, suelo del cuarto ventrículo y con menor frecuencia otras áreas. Se admiten tres estadios, agudo, subagudo y crónico, en el desarrollo de la enfermedad. Microscópicamente, en los casos agudos pueden verse hemorragias petequiales en las zonas señaladas, solo en raras ocasiones las hemorragias son grandes y llamativas. Los hallazgos microscópicos varían también según el estadio y severidad de la enfermedad y son similares en todas las regiones afectadas. En la fase aguda se observa, edema, hemorragias petequiales y desmielinización. Las neuronas no parecen

ser el blanco inicial de las lesiones y, salvo en raras ocasiones muestran algunos cambios, lo que explica la remisión de los signos y síntomas clínicos si se instaura precozmente tratamiento con tiamina. Recientemente se ha descrito vacuolización y degeneración neuronal en el tálamo en la fase aguda de la EW. Si no se administra vitamina B₁ continua la evolución del proceso y en poco tiempo se establece la fase subaguda; en uno a dos días hipertrofia capilar y yemas capilares que en la segunda alcanzan el grado máximo de proliferación; a veces se observa necrosis, a menudo bilateral y simétrica, más frecuente en el tálamo. Al cabo de unos días aparece también reacción astrocítica. A menudo hay destrucción mielínica, con aparición de macrófagos espumosos, y axonal, responsable quizá de la presencia de cromatolisis neuronal en los cuerpos mamilares. En la fase crónica los casos leves pueden mostrar en las regiones afectadas poco más que gliosis discreta y algunos macrófagos con hemosiderina; sin embargo, si los cambios han sido más severos existe pérdida neuronal, gliosis severa que imparte aspecto esponjoso a la zona central de los cuerpos mamilares y abundantes macrófagos con hemosiderina, testigos de las hemorragias previas. Los vasos adquieren morfología habitual ⁽⁷⁾.

En el curso del alcoholismo crónico aparece a veces deterioro intelectual global que se relaciona con la existencia de atrofia cerebral y agrandamiento ventricular. Estudios microscópicos cuantitativos realizados en alcohólicos crónicos demuestran pérdida significativa de neuronas en el córtex frontal superior (área 8 de Brodmann), independientemente de la persona o no de síndrome de Korsakoff o de cirrosis hepática. En un estudio reciente se estudian volúmenes y contajes neuronales en ciertas regiones cerebrales en alcohólicos con EW, con síndrome de Korsakoff y no complicados con estos cuadros, relacionándolos con la antigüedad e intensidad del consumo de alcohol y comparándolos con un grupo grande de control. En este trabajo se confirma la disminución del volumen de la sustancia blanca, en especial en el lóbulo frontal, en todos los alcohólicos sobre todo en los casos con EW (con o sin psicosis de Korsakoff), y se demuestra pérdida de neuronas en la corteza de asociación frontal superior, además tras la aplicación de estudios inmunohistoquímicos parece que la toxicidad afecta a neuronas piramidales no

gabaérgicas ⁽⁸⁾. Estudios microscópicos cuantitativos realizados en alcohólicos crónicos demuestran pérdida significativa de neuronas en el córtex de asociación frontal superior. A fecha se disponen de numerosos trabajos de investigación sobre consumo y/o administración aguda y/o crónica de alcohol etílico tomando como modelo animal de experimentación ratas de laboratorio ⁽⁹⁻¹⁵⁾.

1.2 - JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL PROBLEMA

Se justifica llevar a cabo el estudio de este problema:

- Porque el alcoholismo crónico con bebidas alcohólicas adulteradas es un problema de salud pública en el Perú, por la causa de morbi-mortalidad que produce.
- Porque no se tiene información sobre los daños producidos por las bebidas alcohólicas adulteradas en la corteza cerebral de las personas con alcoholismo crónico que consumen dichas bebidas.
- Porque se quiere conocer si los daños producidos en la corteza cerebral por el consumo crónico de bebidas alcohólicas adulteradas se debe al contenido de etanol de las mismas o a los distintos componentes que contengan como producto de su adulteración.
- Porque los resultados de esta investigación pueden facilitar el diseño de programas de prevención y erradicación de consumo crónico de las bebidas alcohólicas adulteradas.

1.3 - FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Qué alteraciones histológicas existen en la capa granular de la corteza orbitofrontal de ratas albinas sometidas a administración crónica de bebidas alcohólicas adulteradas?

1.4 - HIPÓTESIS

HIPÓTESIS GENERAL

El grupo de ratas albinas sometidas a administración crónica de bebidas alcohólicas adulteradas tendrán mayores alteraciones histológicas a nivel de la capa granular de la corteza orbitofrontal, en comparación con el grupo de ratas control.

HIPÓTESIS ESPECÍFICA (1)

El grupo de ratas albinas sometidas a administración crónica de bebidas alcohólicas adulteradas tendrán mayores alteraciones histológicas a nivel de las neuronas de la capa granular de la corteza orbitofrontal: alteraciones morfológicas y disminución de neuronas granulares por campo, en comparación con el grupo de ratas control.

HIPÓTESIS ESPECÍFICA (2)

Las ratas albinas sometidas a administración crónica de bebidas alcohólicas adulteradas tendrán mayores alteraciones histológicas a nivel de las glías de la serie astrocítica de la capa granular de la corteza orbitofrontal: gliosis, alteraciones morfológicas, en comparación con el grupo de ratas control.

1.5 - OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

1.5.1 - OBJETIVO GENERAL

Determinar las alteraciones histopatológicas de la capa granular de la corteza orbitofrontal de ratas albinas sometidas a administración crónica de bebidas alcohólicas adulteradas.

1.5.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar las alteraciones histológicas de las neuronas granulares de la corteza orbitofrontal: alteraciones morfológicas y disminución de neuronas granulares por campo en las ratas albinas sometidas a administración crónica de bebidas alcohólicas adulteradas.
- Determinar las alteraciones histológicas a nivel de las glías de la corteza orbitofrontal: gliosis, alteraciones morfológicas en las ratas albinas sometidas a administración crónica de bebidas alcohólicas adulteradas.

Capítulo 2

Metodología

2.1 - TIPO DE ESTUDIO:

Estudio experimental, tipo experimental verdadero, la población de 45 ratas de laboratorio se asignó de forma aleatoria a cada uno de los grupos control y experimental, se hace una medición basal y ocurre la intervención por parte del investigador al controlar el factor considerado causal.

2.2 - DISEÑO DE INVESTIGACIÓN:

- Es un estudio prospectivo, porque se capta la información después de la planeación, observando el efecto de la variable independiente en el futuro.
- Es un estudio longitudinal, porque las variables involucradas se miden en tres ocasiones y porque hay seguimiento para estudiar la evolución de la población y así poder comparar los valores de los grupos control y experimental.
- Es un estudio comparativo, porque existe el grupo control y experimental, a fin de comparar las alteraciones histológicas a nivel de la corteza frontal.

2.3 – MUESTRA DE ESTUDIO:

La muestra estuvo constituida por 45 ratas adultas de laboratorio (12 semanas de vida) de sexo masculino, *Rattus norvegicus*, variedad albina, cepa Sprague Dawley. Peso: 300 +/- 10g (Figura 1).



Figura 1. *Rattus norvegicus*. Rata albina, cepa Sprague Dawley.



La población será asignada aleatoriamente a tres grupos de investigación:

- Grupo A: constituido por 15 ratas que a las que se les administro “Tumbaloco”, bebida alcohólica adulterada resultante de la mezcla en partes iguales de Pisco + Cognac + Anisado adulterado.
- Grupo B: constituido por 15 ratas que a las que se les administro “Penal”, bebida alcohólica adulterada resultante de la mezcla en partes iguales de Pisco + Cognac + Anisado + cerveza.
- Grupo O: constituido por 15 ratas que recibieron un placebo (agua).

2.4 - TÉCNICA Y MÉTODO DEL TRABAJO:

El trabajo fue realizado en tres etapas: en la primera etapa o pre experimental se fabricaron las jaulas, bebederos y sonda orogástrica, se compraron también las bebidas alcohólicas adulteradas

ETAPA PRE EXPERIMENTAL

Jaulas

Se fabricaron 24 jaulas para albergar los 45 animales de experimentación, se colocaron 2 animales de experimentación en cada jaula. El motivo por el cual se fabricaron dichas jaulas fue porque no habían jaulas para *Rattus norvegicus* en el mercado, habían jaulas para aves pero no eran las apropiadas, mandar fabricarlas era muy costoso y fue así que se propuso fabricarlas. Las jaulas tenían un volumen de 12000 cm³ (30 cm de largo, 20 cm de ancho, 20 cm de alto). Para la fabricación de las jaulas se utilizó malla metálica gruesa con trabéculas cuadradas de 0,5 pulgadas, es decir una medida aproximada de 1.25 cm de separación entre ellas. Se utilizó malla metálica gruesa debido a que la malla metálica delgada no soportaba las fuerzas mecánicas externas y tendía a deformarse, además la malla metálica gruesa no necesitaba de un armazón de alambre grueso a manera de columnas (Figura 2).

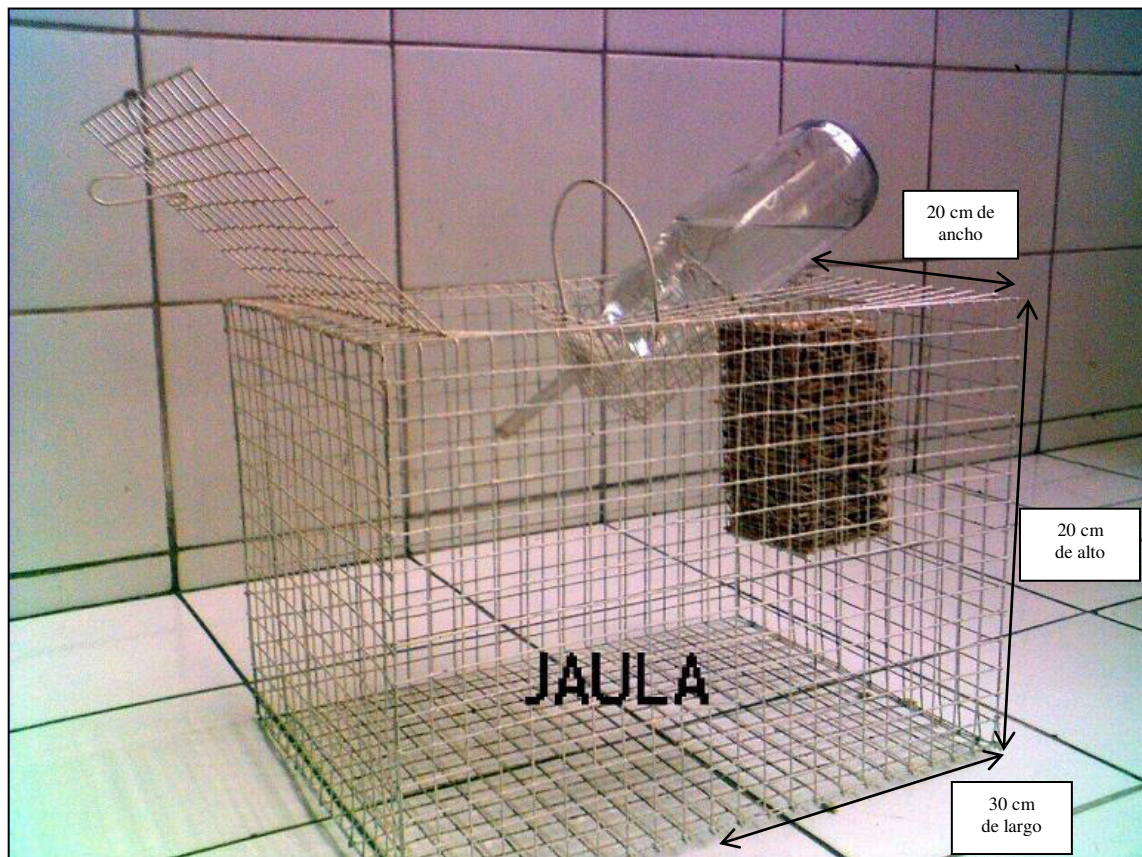


Figura 2. Vista lateral de una jaula fabricada a partir de malla metálica gruesa. Observe que no se ha utilizado alambre grueso a manera de armazón.

Se escogieron trabéculas de 0,5 pulgadas de separación entre ellas pues las mallas de 0,25 pulgadas de separación eran más difíciles de trabajar en la fabricación de las jaulas y al ser pequeñas impedían que las deposiciones de los animales cayeran a la base de aserrín que fue colocado debajo de la jaula. Las trabéculas de 1 pulgada de separación eran muy grandes, no ofrecían seguridad alguna al trabajar en el bioterio y el animal de experimentación podía sacar el hocico por fuera de la jaula y morder cuando uno apoyaba la mano sobre las jaulas, además al ser grande la separación de las trabéculas ocasionaba que las patas de los animales de experimentación resbalaran y cayeran a la base de aserrín que yacía debajo de las jaulas.

Se utilizaron como bebederos envases de vidrio de 500mL, las que llevaban una tapa rosca blanca de plástico con un orificio al centro en donde se colocó una cánula de vidrio perteneciente a un gotero. El orificio de las tapas roscas blancas se hizo utilizando la punta de un soldador pequeño de estaño, la finalidad de ello era hacer un orificio circular con

bordes uniformes ya que si el borde del orificio no es uniforme dejaba pequeños espacios entre él y la cánula de vidrio y el agua goteaba mojando la viruta y por lo tanto la jaula y al animal de experimentación. Una vez hecho el orificio circular se colocó a través de él y mediante presión una cánula de vidrio perteneciente a un gotero. (Figura 3).



Figura 3. Partes del bebedero: envase de vidrio de 500 mL, tapa rosca blanca y cánula de vidrio.

Se colocó el bebedero en un desnivel a manera de rampa con un ángulo de $26,5^\circ$ (Figura 4) que se encontraba empotrado en la parte superior de la jaula, dicho desnivel estaba hecho de malla metálica gruesa con trabéculas cuadradas de 0,25 pulgadas y solo dejaba un orificio pequeño a través del cual se introducía mediante presión la cánula de vidrio. Dichas trabéculas eran la mitad de pequeñas que las trabéculas de la jaula, y esto para evitar las mordidas que los animales de experimentación pudieran hacer a la tapa rosca de plástico y por lo tanto romper la tapa rosca y provocar el posterior derrame del agua a la jaula.

El colocar el bebedero en este desnivel a manera de rampa evitaba así mismo la caída del mismo ante cualquier movimiento forzoso del animal dentro de la jaula e incluso permitía el transporte de la jaula con el bebedero colocado en dicho lugar sin sufrir caída alguna del mismo.



Figura 4. Desnivel a manera de rampa en la cual se coloca el bebedero. Observe el ángulo en el que se coloca el bebedero y el agujero por el cual atraviesa la cánula de vidrio

Se fabricó un comedero (Figura 5) a base de malla metálica gruesa con trabéculas cuadradas de 0,25 pulgadas el cual fue empotrado y suspendido en la parte superior. El comedero fabricado tenía un volumen de 250 cm³ (10 cm de largo, 5 cm de ancho, 5 cm de alto). Se utilizó malla metálica gruesa con trabéculas cuadradas de 0,25 pulgadas debido a que impedía que los granos de cebada caigan con facilidad a través de las mismas, si se hubiera utilizado malla metálica gruesa con trabéculas cuadradas de 0,5 pulgadas los granos hubieran caído y no se hubieran mantenido por mucho tiempo en aquel comedero. Sólo la base superior carecía de malla metálica y estaba descubierta sin malla para colocar el alimento desde la parte externa sin necesidad de abrir la jaula. El hecho de colocar el

alimento por fuera disminuye el tiempo empleado en colocar el alimento a las 30 jaulas y evita así mismo mordidas innecesarias hechas por los animales de experimentación que se encuentran dentro cuando se introduce la mano para colocar el alimento en un comedero que se encontraría dentro de la jaula. El colocar el comedero empotrado y fijado en la parte superior evita caídas de los comederos y del alimento, evitándonos posteriormente la pérdida de tiempo en colocar el comedero y la comida en su lugar. El hecho de colocar el alimento en la parte superior evita la contaminación del mismo por las heces del animal de experimentación; permite el transporte de la jaula con el comedero empotrado sin sufrir caída alguna del mismo incluso ante cualquier movimiento forzoso del animal dentro de la jaula. Se recomienda colocar todo el comedero lleno de cebada hasta el tope para que el mismo peso de los granos los mantenga aprisionados contra la malla y se evite la caída de los granos.



Figura 5. Comedero empotrado en la parte superior. Observe la abertura que se encuentra sólo en la parte superior, el resto del comedero está cerrado por medio de la malla metálica.

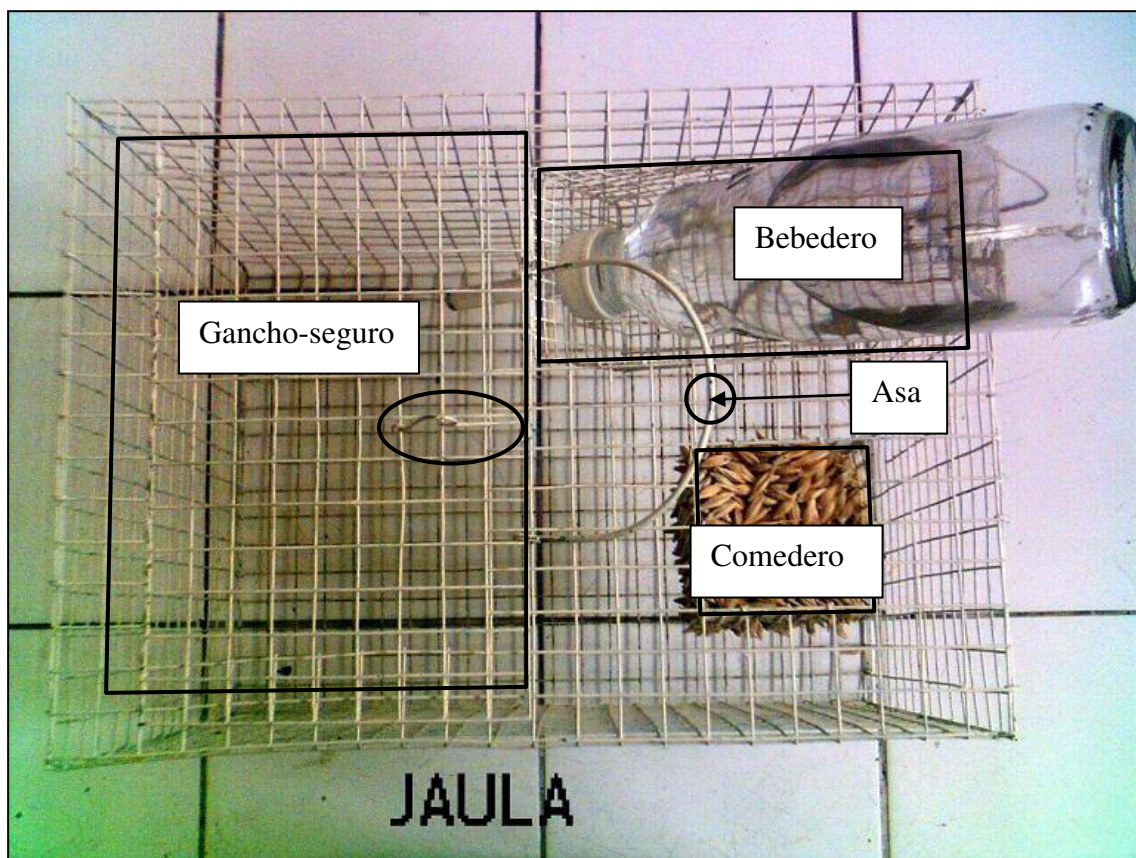


Figura 6. Vista superior de la jaula.

Las jaulas poseían una puerta que se abría hacia fuera y sólo desde afuera pues poseía un gancho con funciones de seguro de la puerta (Figura 6) que solo podía maniobrase desde afuera. Aquello era muy necesario pues evitaba que cualquier empujón de la cabeza del animal abriera dicha puerta. Se colocó así mismo un asa hecho de cable grueso para el transporte del animal de experimentación dentro de la jaula. Las jaulas que tenían una altura de 20 cm eran llenadas con viruta estéril hasta una altura de 5 cm desde su base, dichas jaulas estaban separadas de la superficie sobre la cual se apoyaba por medio de aserrín, es decir, el aserrín no estaba en contacto directo con la superficie del animal de experimentación para evitar posibles reacciones alérgicas del mismo. La viruta cumplía una función de aislante térmico para con el animal de experimentación y lo mantenía abrigado, mientras que el aserrín que estaba por debajo de la jaula disminuía la humedad debido a la viruta húmeda

Alimento

El alimento que se brindó a los animales de experimentación consistió en cebada (Figura 7), a una cantidad de 10 mg cebada/Kg de masa corporal/día. No se les dio otro alimento aparte de la cebada pues poseía todos los requerimientos nutricionales para el animal de experimentación, esto debido a los orígenes mismos de estos animales quienes fueron originarios de los pastizales de cebada en Noruega, de allí su nombre científico. La cebada es un alimento natural libre de algún proceso industrial, posee una cubierta a manera de cáscara muy fina la cual el animal de experimentación retira muy cuidadosamente antes de ingerir la semilla. Al estar la semilla protegida por aquella cubierta lo hace un alimento idóneo para dichos animales de experimentación pues nos evita la contaminación del alimento y la posterior presencia de enfermedades. Además la cáscara de la cebada cumplió una función de disminuir la humedad interna de la jaula al absorber los restos de agua por su naturaleza a base de celulosa. Se le brindó agua potable *ad libitum* (a voluntad) la cual se colocó en los bebederos, a una cantidad aproximada de 250mL, es decir se colocó agua hasta la mitad del bebedero para evitar que el mismo peso del agua empuje hacia abajo el mismo y pueda gotear y/o derramarse.



Figura 7. Cebada: único alimento brindado a los animales de experimentación, el cual se colocó en los comederos empotrados en la parte superior de las jaulas.

Sonda orogástrica

Se anduvo buscando en el mercado sondas orogástricas para *Rattus norvegicus* adultas de la cepa Sprague Dawley y no habían, importarlas del exterior era una posibilidad pero el costo elevado de las mismas no nos permitía hacerlo. Fue así que se decidió mandarlas fabricar (Figura 8).

Se utilizó como cánula gruesa de acero una aguja de punción lumbar N° 20 a la cual se le cortó el bisel y en su lugar se colocó y mandó soldar una pequeña esfera hecha a base de una aleación de plata y bronce para darle forma roma y redonda a la punta de la sonda orogástrica. Hay que recordar que la aleación debía ser lo suficientemente dura como para soportar las mordidas del animal. Al joyero al cual se mandó soldar aquella aleación se le explicó con dibujo en mano todos los detalles de lo que se esperaba obtener. Luego se realizó el pulido del mismo. Se procedió también a desobstruir la luz de la cánula de restos de la aleación colocada y a hacer un agujero al centro de la punta roma y redonda (Figura 9), ya que por allí debía fluir libremente la sustancia a administrar.

El diámetro de la punta roma y redonda de la sonda orogástrica debía ser más grande que la luz del tracto respiratorio y más pequeño que la luz del tracto digestivo por lo que se hizo estudios pilotos previos mediante el sacrificio de un animal de experimentación de las mismas características de peso, edad y cepa ya antes mencionadas para estudiar la anatomía de ambos tractos. Se tuvo también que estudiar la curvatura perfecta que debía darse a la cánula para evitar posibles daños en la mucosa del tracto digestivo.



Figura 8. Vista lateral de la sonda orogástrica. Observe la curvatura de la cánula de acero, la punta roma y redondeada en un extremo y la jeringa que se coloca anexada a nuestra sonda orogástrica



Figura 9. Vista superior de la sonda orogástrica. Observe con detalle la naturaleza redondeada y el orificio al centro del extremo de la sonda orogástrica

Bebidas alcohólicas adulteradas

Se compraron las bebidas alcohólicas adulteradas en la zona denominada “La Huerta Perdida”, distrito de Barrios Altos en el Cercado de Lima, zona en la que antiguamente existía una gran huerta bajo los cuidados de la hermanas del Convento del Padre Mogrovejo.

En la zona denominada “La Huerta Perdida” y en sus alrededores existe hoy una gran cantidad de establecimientos que venden a libre albedrío bebidas alcohólicas adulteradas (Figura 10) a un muy bajo costo y sin registro sanitario alguno. Lugares en los que podemos encontrar la venta de Pisco, Cognac y Anisado adulterados, a la módica suma de un nuevo sol. Los lugareños las mezclan y les dan ciertos nombres a sus preparados: “Racumín” (Pisco adulterado + 1 sobre de jugo de naranja azucarado), “Tumbaloco” (partes iguales de Pisco adulterado + Cognac adulterado + Anisado adulterado), “Penal” (partes iguales de Pisco adulterado + Cognac adulterado + Anisado adulterado + cerveza). Recordar que únicamente la cerveza es una bebida alcohólica permitida y con registro sanitario, pero fue usada debido a que un preparado alcohólico, el llamado “Penal” llevaba cerveza como uno de sus ingredientes.

El origen de los nombres de los preparados alcohólicos fue investigado mediante un trabajo de campo en el año 1999 cuando realizaba mi trabajo de investigación en Patología Experimental; un grupo de compañeros y yo fuimos reiteradas veces a la zona denominada “La Huerta Perdida” a hablar con los lugareños y con las personas que consumían dichos preparados alcohólicos, fueron también ellos quienes nos explicaron al detalle la forma de prepararlos.



Figura 10. Bebidas alcohólicas adulteradas. De derecha a izquierda: Cognac, Anisado, Pisco y cerveza. Recordar que la cerveza es la única bebida alcohólica permitida y con registro sanitario.

Los preparados alcohólicos (Figura 11) una vez hechos fueron colocados en un envase de vidrio de color ámbar de 500mL y cerrado con un tapón de caucho a través del cual se colocaba una jeringa cada vez que se procedía a extraer el volumen ya determinado a administrar a cada animal de experimentación, luego de la extracción del volumen se retiraba la jeringa.

El preparado alcohólico fue hecho sólo para el día, luego se procedió a desechar el remanente. Esto fue hecho con la finalidad de evitar la disminución de la cantidad de etanol debido a evaporación del mismo por su naturaleza volátil.



Figura 11. Preparado alcohólico denominado “Tumbaloco”. Observe el nivel del preparado alcohólico, esto debido a que se preparaba sólo la cantidad a usar durante el día

La palabra “Tumbaloco” y la receta de este preparado es originaria de la “La Huerta Perdida”, se le denomina así pues este preparado alcohólico es la bebida de elección de los indigentes y personas con dependencia alcohólica entre quienes se encuentran muchas personas con alteraciones psiquiátricas a las que los lugareños llaman “locos”, quienes al tomar el preparado alcohólico quedan tendidos por la calle. La palabra “Penal” también es originaria de esta zona, pero fue creada por los primeros lugareños que llegaron alguna vez al penal y fue allí en la que añadieron cerveza a su preparado alcohólico denominado

“Tumbaloco” creando un nuevo preparado alcohólico a la que llamaron esta vez “Penal” en honor al lugar en la que fuera creado. Creé así mismo un tercer preparado al que llamé “Etanol” a base de etanol puro y agua destilada (Figura 12), aquello con el fin de remedar la concentración de etanol presente en los preparados mencionados y estandarizar la cantidad de gramos de etanol, no se administró a ningún grupo.



Figura 12. Ingredientes del tercer preparado alcohólico: etanol absoluto + agua destilada

Bioterio

Se utilizó una de las habitaciones del sótano del Bioterio (Figura 13) de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Dicha habitación no fue creada para el trabajo con ratas albinas sino con perros por lo que constaba de 12 cubículos, 6 en la parte inferior y 6 en la parte superior dispuestas a cada lado de la habitación. Poseía unas pequeñas ventanas en la parte superior para la entrada de aire fresco (Figura 14). Como los animales fueron llevados en época de invierno se creó un microclima con una temperatura constante de 20 °C mediante un calentador eléctrico y luz/oscuridad de 12 h c/u para evitar el estrés de los animales de experimentación y darles las condiciones

perfectas para su desarrollo. Como la habitación estaba en el sótano del Bioterio no había ruidos molestos que estresaran a los animales de experimentación. Se utilizaron sólo los cubículos de la parte superior para trabajar con los animales de experimentación, 4 de los 6 cubículos se destinaron para colocar los animales de experimentación en sus respectivas jaulas, uno de los 2 cubículos restantes se utilizó para colocar todas las herramientas usadas para el manejo de los animales de experimentación, el otro cubículo restante se utilizó como lugar para realizar el sondeo orogástrico. Sólo se utilizó uno de los cubículos de la parte inferior en donde se colocaron los sacos de cebada, sacos de aserrín y sacos de viruta. El tacho de desechos no estuvo colocado en aquella habitación sino fuera de ella para evitar la presencia de moscas y la posterior contaminación. En los 4 cubículos de la parte superior se colocó una base de 2 cm de aserrín sobre la cual se colocaron las 24 jaulas. En el cubículo en la que se realizó el sondeo orogástrico se colocó una base de 3 cm de viruta. Recordar que la viruta se colocó dentro de las jaulas y no por fuera, hasta una altura de 5 cm de la base. La limpieza del bioterio fue hecha 3 veces a la semana y no se utilizaron solventes orgánicos, se utilizó tan solo agua, un trapeador, una escoba y un recogedor. La entrada a la habitación del bioterio fue hecha siempre con mandil y con un lavado previo de manos, fuera de la habitación había 3 fuentes de agua potable y una mesa de mayólica grande en forma de “L” (Figura 15) la cual se utilizó sobre todo el día del sacrificio de los animales de experimentación. Las horas de trabajo dentro del bioterio fueron en las mañanas de 6am a 7am y en las noches de 7pm a 12am.

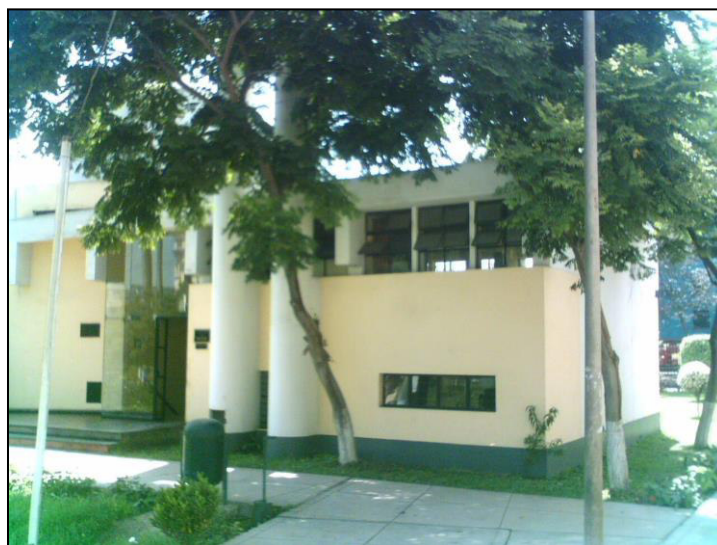


Figura 13. Vista del exterior del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNMSM



Figura 14: Vista externa de la habitación del Bioterio



Vista interna de la habitación del Bioterio

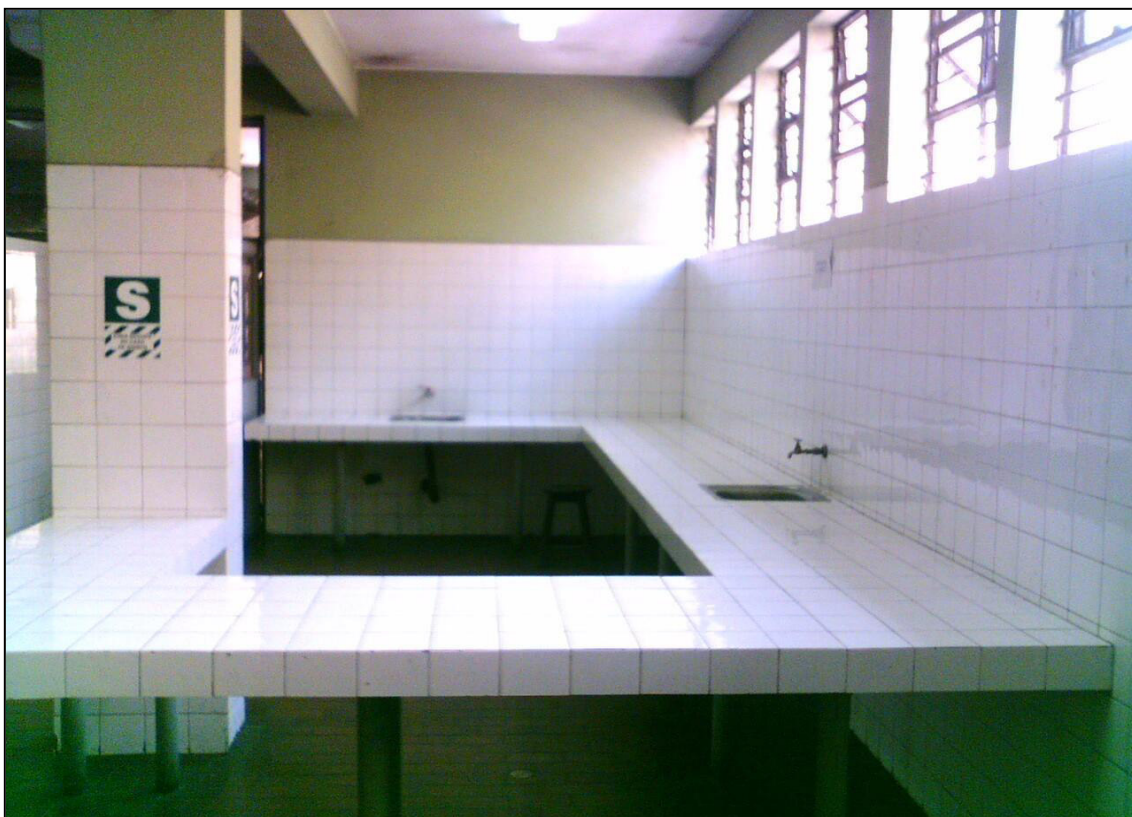


Figura 15: Mesa de mayólica en forma de “L”. Allí se realizó el sacrificio de los animales de experimentación.

ETAPA EXPERIMENTAL

Una vez comprados los animales de experimentación, fueron llevados al bioterio de la Facultad de Medicina de la UNMSM; se procedió al pesaje y aleatorización y división en dos grupos: control y experimental, utilizando una tabla de aleatorización. El grupo experimental se subdividió a su vez en tres subgrupos: Tumbaloco, Penal y Etanol al 20%. Se realizó una medición basal de corte conductual al modelo animal de experimentación antes de la aplicación de las bebidas alcohólicas adulteradas que consistió en buscar el “reflejo de enderezamiento aéreo”. Dicha medición nos dio información indirecta sobre el estado previo en que se encuentra la corteza frontal de dicho modelo animal. Se procedió a la colocación en jaulas de mallas metálicas individuales de 30 cm x 20,25 cm x 21,25 cm con el comedero y bebedero empotrados en la parte superior de la jaula, a modo de evitar la contaminación de las mismas con las heces del animal de experimentación, en la parte

inferior de la jaula se colocó viruta autoclavada. Todas las jaulas fueron colocadas en uno de los ambientes del bioterio, garantizándose temperatura de 20 °C mediante un calentador eléctrico y luz/oscuridad de 12 h c/u. Como alimento se les dio cebada en razón de 100g/kg de peso/día y agua en razón de 80–100ml/kg de peso/ día.

Los licores a administrar fueron comprados en las cantinas de los alrededores de la “Huerta Perdida” de Barrios Altos (Lima-Perú). Los distintos preparados (Tumbaloco, Penal) fueron preparados cada día para garantizar que se tenga siempre el mismo contenido de etanol y metanol, se colocaron dichos preparados en frascos de vidrios con tapas de goma. Se enviaron dichos preparados al Centro de Información, Control Toxicológico y Apoyo a la Gestión Ambiental (CICOTOX) para el análisis cuantitativo de etanol y metanol por el método de espectrofotometría de absorción atómica. Las bebidas alcohólicas adulteradas contienen alrededor de 20% de etanol y metanol en partes por millón (ppm) ⁽¹⁶⁾. La vía de administración fue la enteral utilizándose una sonda orogástrica constituida en base a una aguja de punción lumbar número 20, en la cual se había modificado el bisel, soldándose en la punta del mismo una aleación de plata y bronce para dar forma roma y redonda a la sonda orogástrica. A todos los animales de experimentación se les dió la misma cantidad en gramos de etanol puro según kilogramo de peso corporal, mediante extrapolación de una persona adulta de sexo masculino que pese 70 kg y consuma una botella diaria (750 ml) de bebida alcohólica adulterada (20% de etanol).

La forma a la que se llegó para calcular la dosis en gramos será descrita a continuación:

A.
$$\text{Hombre de 70kg: g de etanol puro} = \frac{(750\text{ml})(20^0)(0,8)}{100} = 120 \text{ g OH}$$

Donde: 750ml = ml consumidos.

20⁰ = graduación de la bebida alcohólica adulterada (según análisis de espectrofotometría por absorción de gases)

0,8 = densidad del etanol.

Entonces: 120g OH para un hombre de 70kg

$\text{Dosis para el hombre: g OH/kg de peso} = 1,71 \text{ g OH/kg de peso del Hombre}$
--

Uno de los mayores motivos de confusión al referirse a los estudios sobre el etanol es la ligereza con la que se revisan las condiciones experimentales al efectuar comparaciones entre diferentes trabajos. Las extrapolaciones que se intentan establecer entre los resultados de experimentos con animales de laboratorio a menudo son absurdas y en otras ocasiones muy difíciles de sustentar. El metabolismo basal, o sea la producción de calor durante 24 horas en condiciones de reposo, al ser calculada por kg de peso corporal resultó mayor mientras menor fuera el peso corporal, motivo por el cual la dosis se calcula por m² de superficie corporal en lugar de kg de peso. En conclusión, tal como era de esperarse al comparar los resultados de los experimentos en el hombre y la rata, dicha comparación es más objetiva al correlacionarlos con la energía liberada en función de la superficie corporal y no del peso corporal. Por lo tanto el metabolismo basal para una rata de laboratorio es aproximadamente 4 veces mayor que para el hombre ⁽¹⁷⁾:

Dosis para la rata: g OH/kg de peso = $1,71 \times 4 = 6,85$ g OH/kg de peso de la rata

Nota: LD50 OH = 10.6 g/kg (Vía oral, ratas jóvenes); 7.06 g/kg (Vía oral, ratas adultas).

B.

Rata de 300g: g de etanol puro = 2,05g OH = $\frac{(X\text{ml})(20^0)(0,8)}{100}$

Entonces: 12,8 ml de bebida alcohólica adulterada de 20°.

Se les dio la dosis establecida cada día, dividida en 2 oportunidades por dos motivos. El primer motivo es que la dosis a la que se llegó es de 6,85 g OH/kg de peso de la rata, la cual está muy cerca de la dosis letal 50 (LD50) que vendría a ser de 7,06 g/kg por vía oral para ratas adultas. El segundo motivo es que la capacidad del volumen del estómago de una rata adulta es alrededor de 7 ml, siendo el volumen a administrar para la dosis antes mencionada de 12,8 ml. Se le administró dicha dosis por un tiempo de 12 semanas a grupos de 15 ratas cada una. Luego de haberles administrado las distintas bebidas, por un tiempo de 12 semanas, se procedió al sacrificio del animal mediante decapitación, extrayendo cuidadosamente el encéfalo, y no demorando más de 4 minutos desde el inicio de la decapitación y la colocación del encéfalo de la rata en su correspondiente frasco de formol neutro al 10%. Se utilizó el método de la decapitación, pues el uso de anestésicos y/o analgésicos producen de por sí alteraciones a nivel de las membranas neuronales. La extracción del encéfalo fue hecha

cuidadosamente sin dañar el parénquima cerebral y en un tiempo no mayor de 4 minutos para no ver alteraciones histológicas debidas a lesión neuronal isquémica por hipoxia o por traumatismos. Luego de haber sido fijados los encéfalos en formol por un lapso de 48 horas se procedió a la realización de dos cortes coronales a nivel frontal con un espesor de ± 1 mm. Uno de los cortes coronales fue incluido en parafina para la elaboración de láminas histológicas con coloración Hematoxilina & Eosina (H&E) e inmunohistoquímica para GFAP; el otro corte coronal fue congelado para la elaboración de láminas histológicas con coloración Argéntica del Río Ortega impregnación simple. Una vez obtenidas las láminas histológicas se procedió a su estudio utilizando la microscopia de luz a 200X y 320X. Se efectuó la comparación de los resultados al final del estudio realizando un estudio morfométrico con el programa JMicrovision 1.2.5, con el cual se redibujó el perfil neuronal para poder hallar la superficie de cada una de ellas.

2.5 - PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS:

El procesamiento de los datos se realizó con el programa SPSS para Windows versión 15.0. Se realizó estadística univariada basada en frecuencias, porcentajes, medidas de tendencia central y de dispersión relativa. Para demostrar la presencia de diferencia estadísticamente para las variables peso, área promedio de neuronas sin necrosis, porcentaje promedio de neuronas necróticas y el número de astrocitos se empleó el análisis de varianza ANOVA previa demostración de la homogeneidad de varianza con el test de Levene. Las diferencias entre grupos de investigación fueron determinadas mediante análisis post hoc con el test de Scheffe. Los cálculos fueron realizados con un intervalo de confianza del 95 %.

2.6 – DEFINICIÓN Y OPERACIONALIZACION DE VARIABLES:

VARIABLES INDEPENDIENTE

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	CRITERIO DE MEDICIÓN	INSTRUMENTO
ADMINISTRACIÓN DE ALCOHOLES ADULTERADOS	Suministro vía sonda orogástrica de alcoholes adulterados durante 12 semanas.	Cualitativa	Nominal	A) TUMBALOCO: Pisco+anisado+cognac. B) PENAL: Pisco+anisado+cognac+cerveza C) Agua.	Ficha de Recolección de datos

VARIABLES DEPENDIENTES

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	CRITERIO DE MEDICIÓN	INSTRUMENTO
ÁREA PROMEDIO DE NEURONAS SIN NECROSIS.	Superficie determinada por neuronas sin necrosis en la capa granular de la corteza orbitofrontal de ratas.	Cuantitativa	De razón	Área en μm^2	Ficha de Recolección de datos
PORCENTAJE PROMEDIO DE NEURONAS NECROTICAS	Fracción obtenida mediante el cociente entre la superficie generada por las neuronas necróticas y el número total de neuronas (con o sin necrosis) en la capa granular.	Cuantitativa	De razón	Porcentaje (%)	Ficha de Recolección de datos
NÚMERO DE ASTROCITOS	Cantidad obtenida mediante el recuento de astrocitos en la capa granular de la corteza orbitofrontal.	Cuantitativa	De razón	Número de astrocitos en capa granular por lámina histológica.	Ficha de Recolección de datos

Capítulo 3

Análisis de Datos

3.1- RESULTADOS

Se incluyó 15 ratas por grupo de investigación. No existió diferencia estadísticamente significativa en el peso de los animales al inicio (ANOVA; $p = 0.350$) por lo que estos fueron estadísticamente comparables (Tabla 1). No se observó variaciones significativas en el peso entre grupos al final del experimento ($p = 0.823$).

TABLA 1: Peso promedio de los animales de experimentación al inicio y final de la investigación.

GRUPO	PESO INICIAL	PESO A LAS 8 SEMANAS
CONTROL (O)	315.5 ± 35.2 g	312.5 ± 33.5 g
A	308.6 ± 33.4 g	289.3 ± 42.6 g
B	307.9 ± 33.3 g	302.1 ± 39.2 g
VALOR p	0.350	0.823

El análisis realizado a los licores adulterados mediante espectrofotometría por absorción atómica (CICOTOX) mostró que el mayor contenido de etanol y metanol fue presente en el pisco adulterado (Tabla 2).

La norma indica que la cantidad máxima de metanol en las bebidas alcohólicas no debe exceder de 3g/L, en las bebidas alcohólicas adulteradas analizadas puede verse el gran contenido de metanol llegando a ser casi 10 veces superior a la norma.

TABLA 2: contenido de etanol y metanol de las bebidas alcohólicas adulteradas.

BEBIDA ALCOHÓLICA ADULTERADA	CONTENIDO ETANOL (g/L)	CONTENIDO METANOL
Pisco adulterado	23.68	29.51 g/L
Anisado adulterado	14.16	19.67 g/L
Cognac adulterado	13.17	17.25 g/L
Cerveza	5.00	0.000032 ppm

El análisis cualitativo realizado con la finalidad de determinar el efecto de los alcoholes adulterados durante 12 semanas sobre la capa granular de la corteza orbitofrontal mostró que los principales trastornos fueron la muerte de las neuronas granulares y el aumento de las glías de la serie astrocítica.

El análisis cuantitativo del efecto de los licores adulterados sobre la capa granular de la corteza orbitofrontal incluyó la determinación del área promedio de neuronas sin necrosis, el porcentaje promedio de neuronas necróticas y el número de astrocitos por grupo de investigación.

El área promedio de neuronas vivas de la capa granular (Tabla 3) de la corteza orbitofrontal fue mayor en el grupo control, la menor área promedio se presentó en el grupo B existiendo diferencia estadísticamente significativa con el grupo control ($p = 0.001$) y con el grupo A ($p = 0.002$).

TABLA 3: Área promedio de neuronas sin necrosis en la capa granular de corteza frontal por grupo de investigación.

GRUPO	ÁREA PROMEDIO NEURONAS VIVAS	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
CONTROL (O)	71.6 ± 11.9 μm^2	61.2	84.2
A	70 ± 4.4 μm^2	66	74.5
B	49.5 ± 22.7 μm^2 ^{a,b}	29	72.9

p < 0.001; ANOVA de un factor.

a: diferencia estadísticamente significativa (p < 0.05) con grupo control.

b: diferencia estadísticamente significativa (p < 0.05) con grupo A.

El porcentaje promedio de neuronas necróticas fue menor en el grupo control y mayor en los grupos A y B (Tabla 4). El mayor porcentaje de neuronas necróticas se observó en el grupo B el cual fue estadísticamente superior que en el grupo O (p < 0.001); el porcentaje de neuronas necróticas en el grupo A también fue estadísticamente superior que en el grupo O (p < 0.001). Esto se muestra en las figuras 16-24.

TABLA 4: Porcentaje promedio de neuronas necróticas en la capa granular de corteza frontal por grupo de investigación.

GRUPO	% PROMEDIO DE NEURONAS MUERTAS	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
CONTROL (O)	28.3 %	26.6	30.2
A	33.0 % ^a	32.5	33.5
B	34.1 % ^a	33.2	34.9

p < 0.001; ANOVA de un factor.

a: diferencia estadísticamente significativa (p < 0.05) con grupo control.

El número promedio de astrocitos en la capa granular orbitofrontal fue estadísticamente superior en los grupos A (p = 0.011) y B (p < 0.001) en comparación con el grupo control. Asimismo, el número de astrocitos fue mayor en el grupo B en comparación con el grupo A (p < 0.001). Esto se muestra en la tabla 5 y figura 25-33.

TABLA 5: Número de astrocitos en capa granular de corteza frontal por grupo de investigación.

GRUPO	NÚMERO DE ASTROCITOS	VALOR MÍNIMO	VALOR MÁXIMO
CONTROL (O)	248.1 ± 6.7	242	255
A	255 ± 7.7 ^a	247	262
B	376 ± 1.5 ^{a,b}	365	378

p < 0.001; ANOVA de un factor.

a: diferencia estadísticamente significativa (p< 0.05) con grupo control.

b: diferencia estadísticamente significativa (p< 0.05) con grupo A.

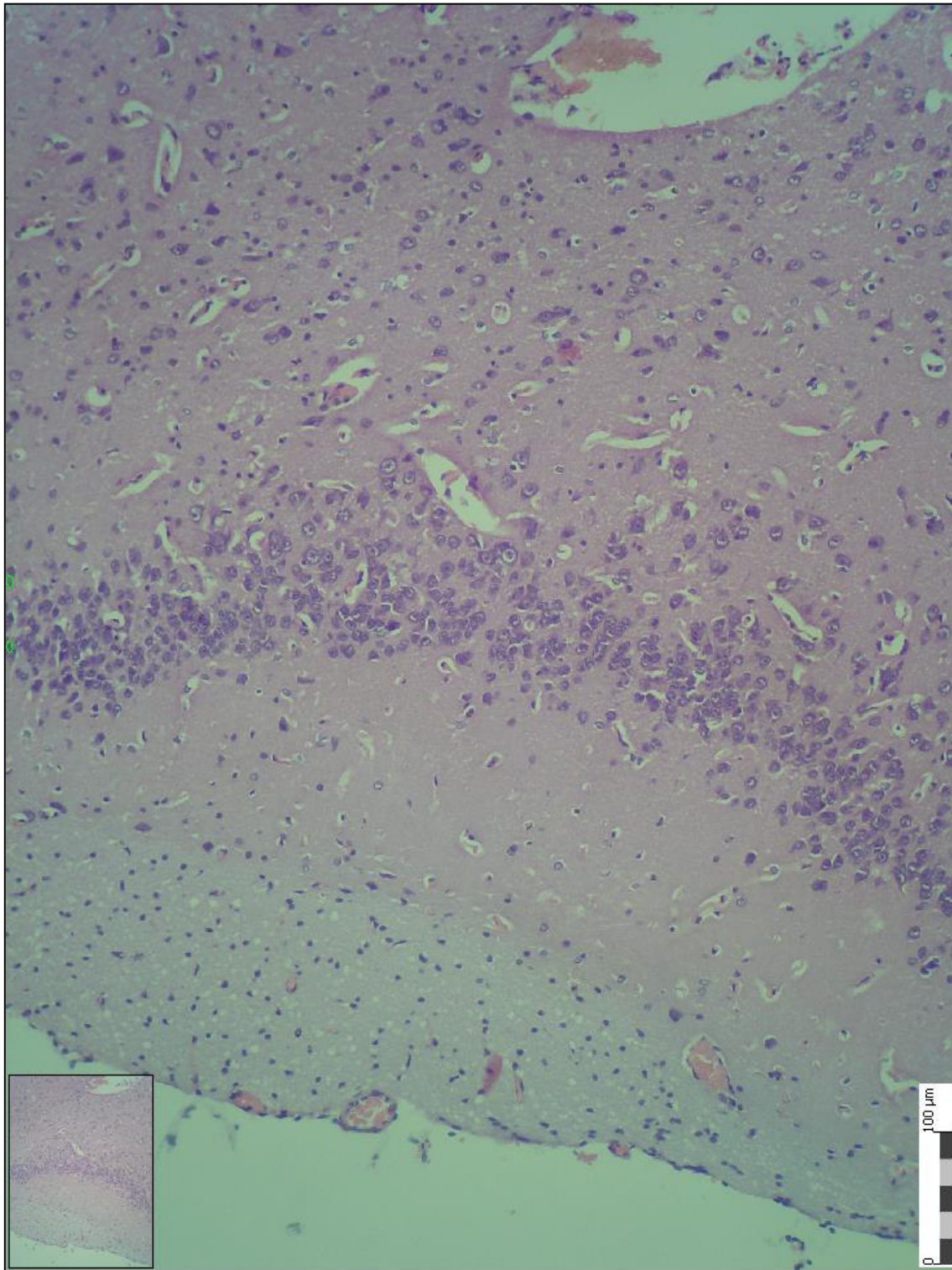


Figura 16: Capa granular de corteza órbitofrontal de *Rattus norvegicus*, GRUPO CONTROL O. Coloración Hematoxilina & Eosina, 200 X.

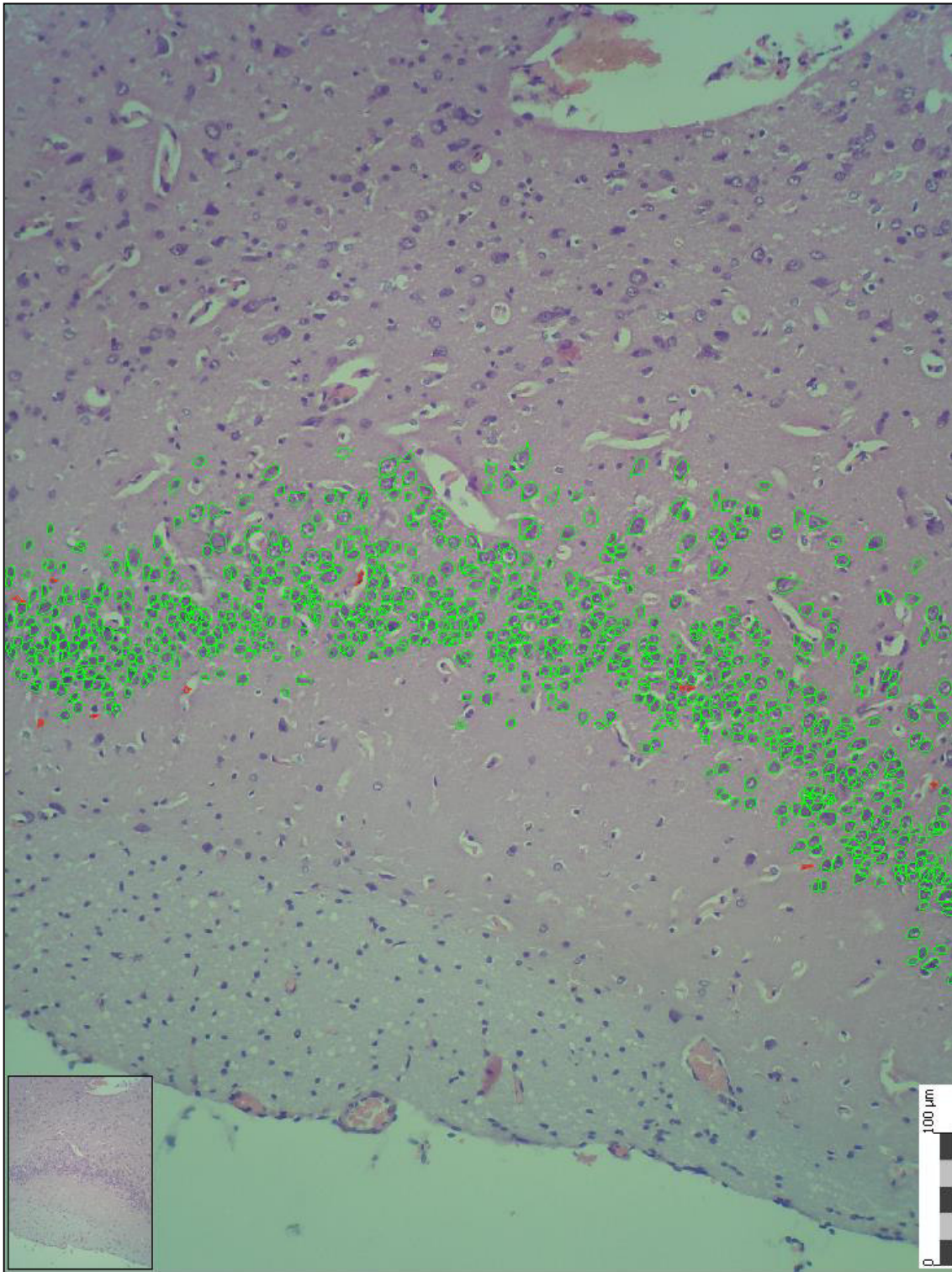


Figura 17: Capa granular de corteza órbitofrontal de *Rattus norvegicus*, GRUPO CONTROL O. Coloración Hematoxilina & Eosina, 200 X. Análisis morfométrico JMicrovision v1.25

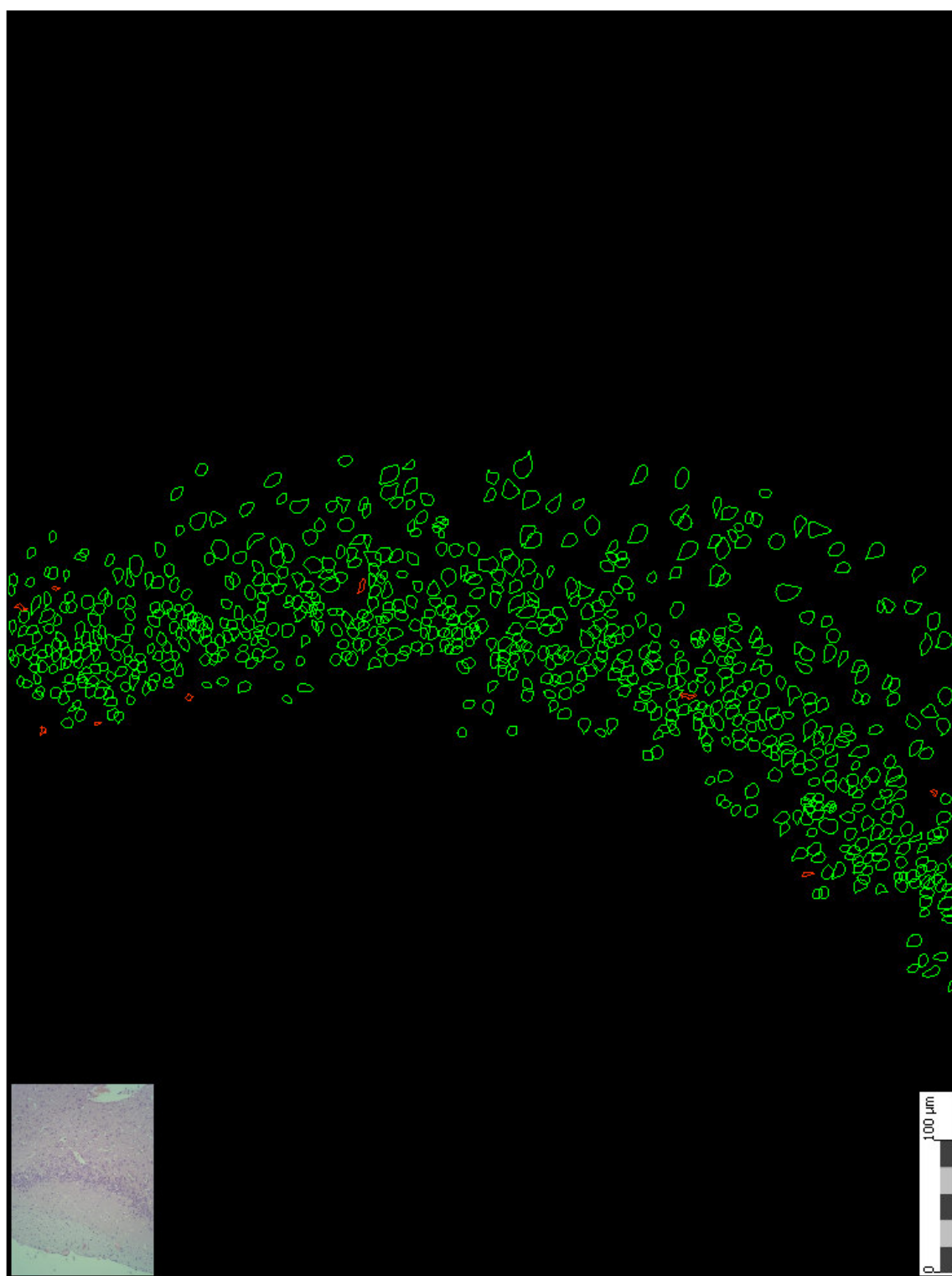


Figura 18: Capa granular de corteza orbitofrontal de *Rattus norvegicus*, GRUPO CCONTROL O. Coloración Hematoxilina & Eosina, 200 X. Análisis morfométrico JMicrovision v1.25 con sustracción de imagen.

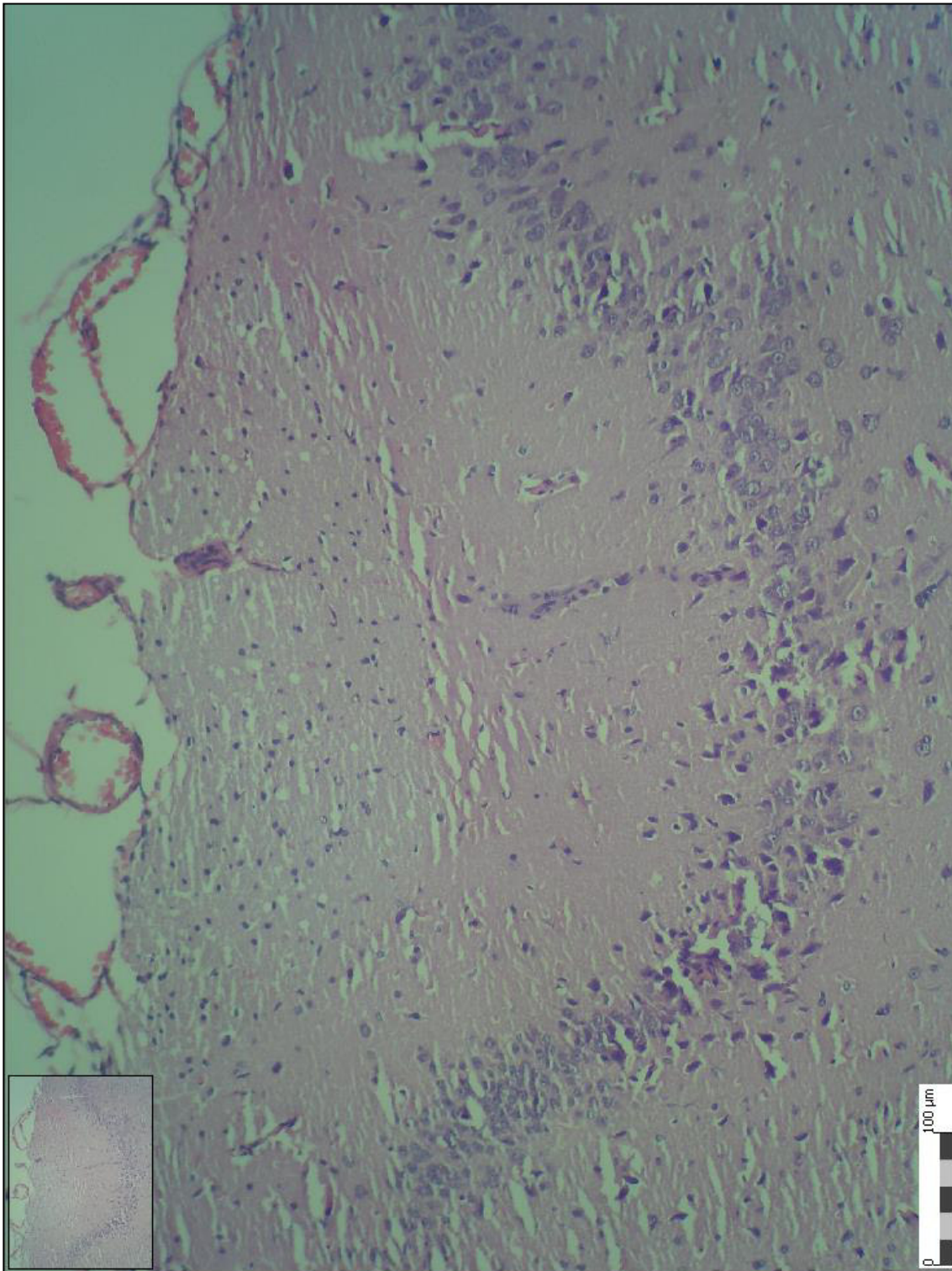


Figura 19: Capa granular de corteza órbitofrontal de *Rattus norvegicus*, GRUPO EXPERIMENTAL A. Coloración Hematoxilina & Eosina, 200 X.

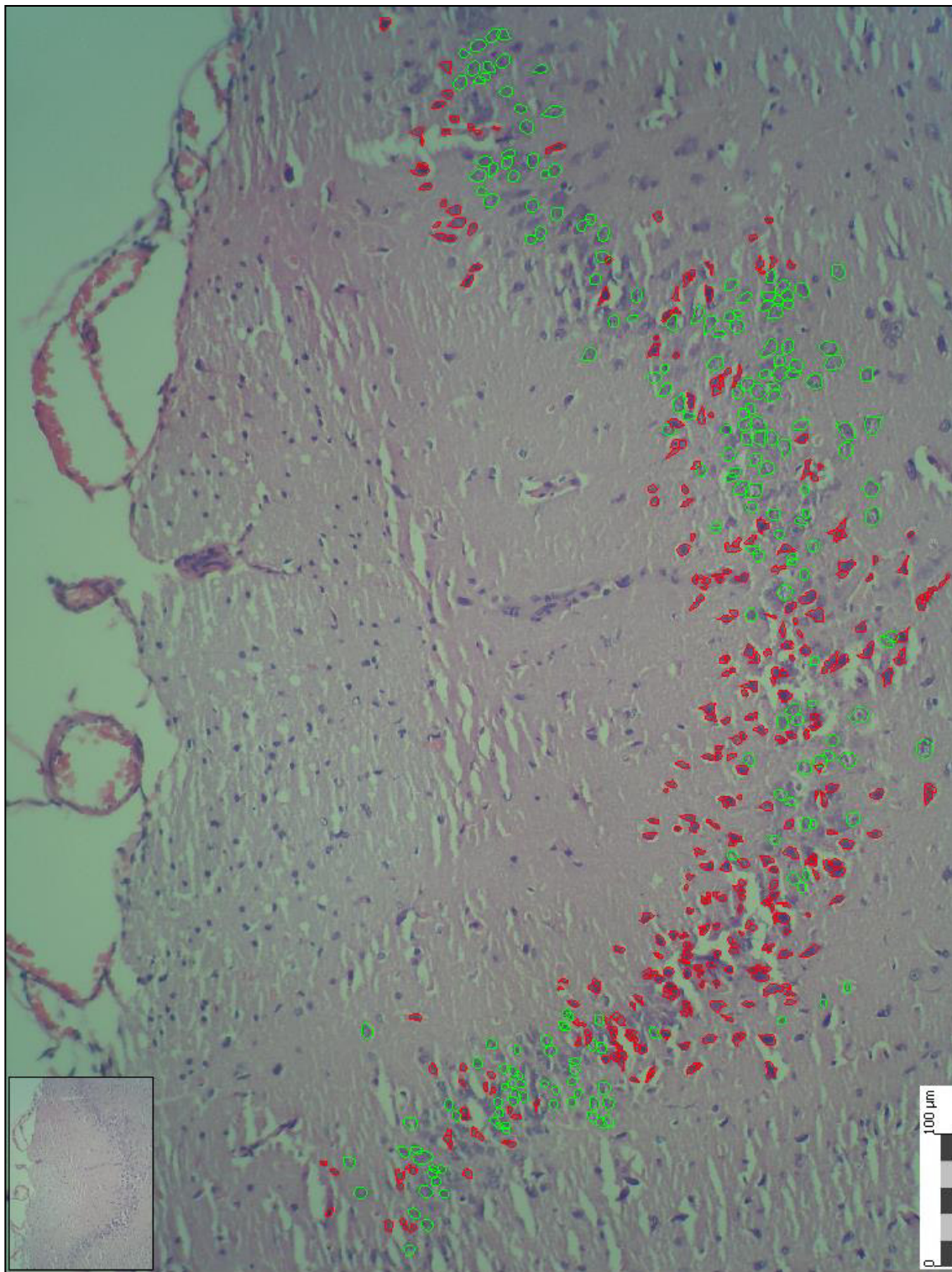


Figura 20: Capa granular de corteza orbitofrontal de *Rattus norvegicus*, GRUPO EXPERIMENTAL A. Coloración Hematoxilina & Eosina, 200 X. Análisis morfométrico JMicrovision v1.25

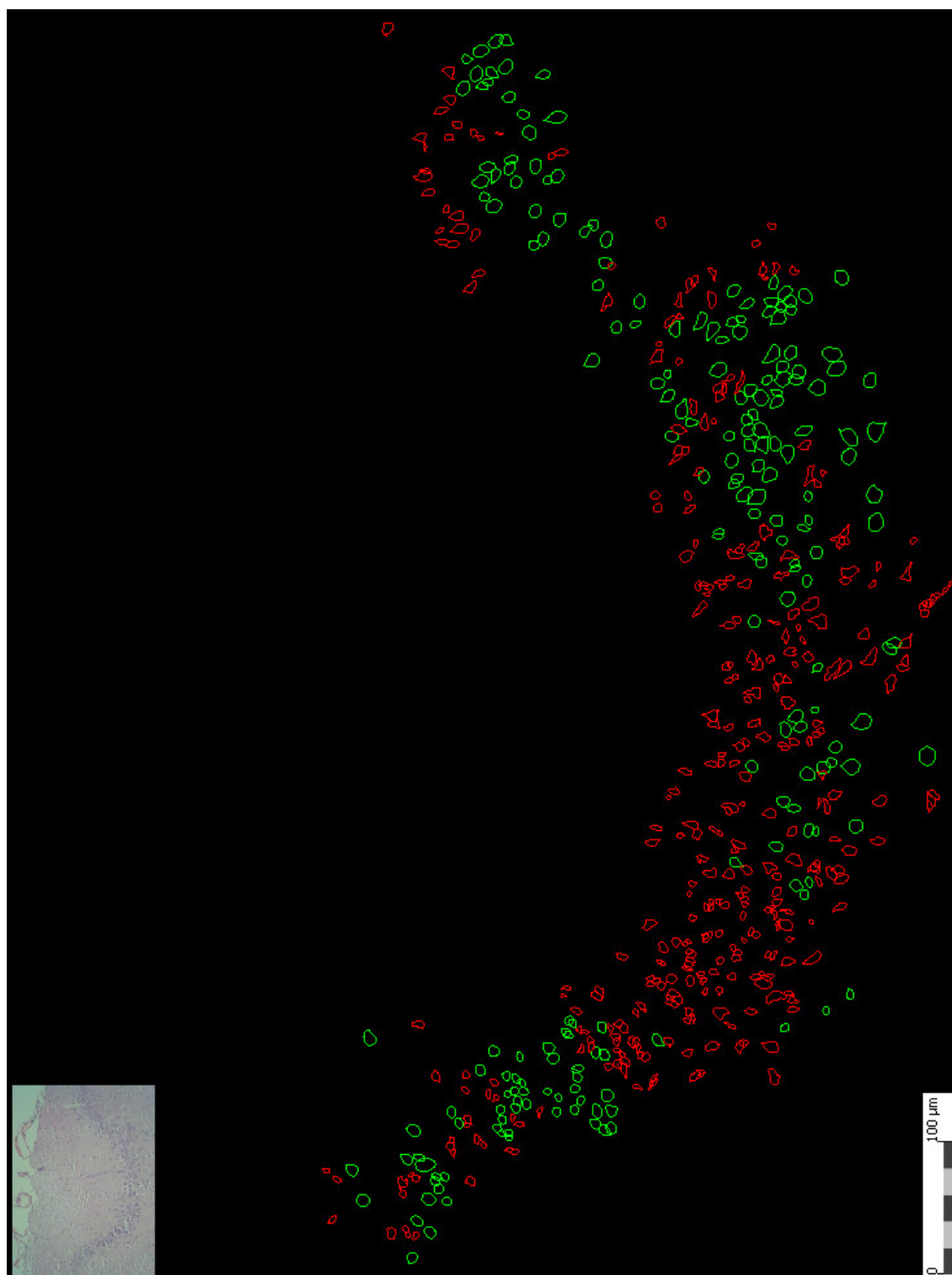


Figura 21: Capa granular de corteza orbitofrontal de *Rattus norvegicus*, , GRUPO EXPERIMENTAL A. Coloración Hematoxilina & Eosina, 200 X. Análisis morfométrico JMicrovision v1.25 con sustracción de imagen.

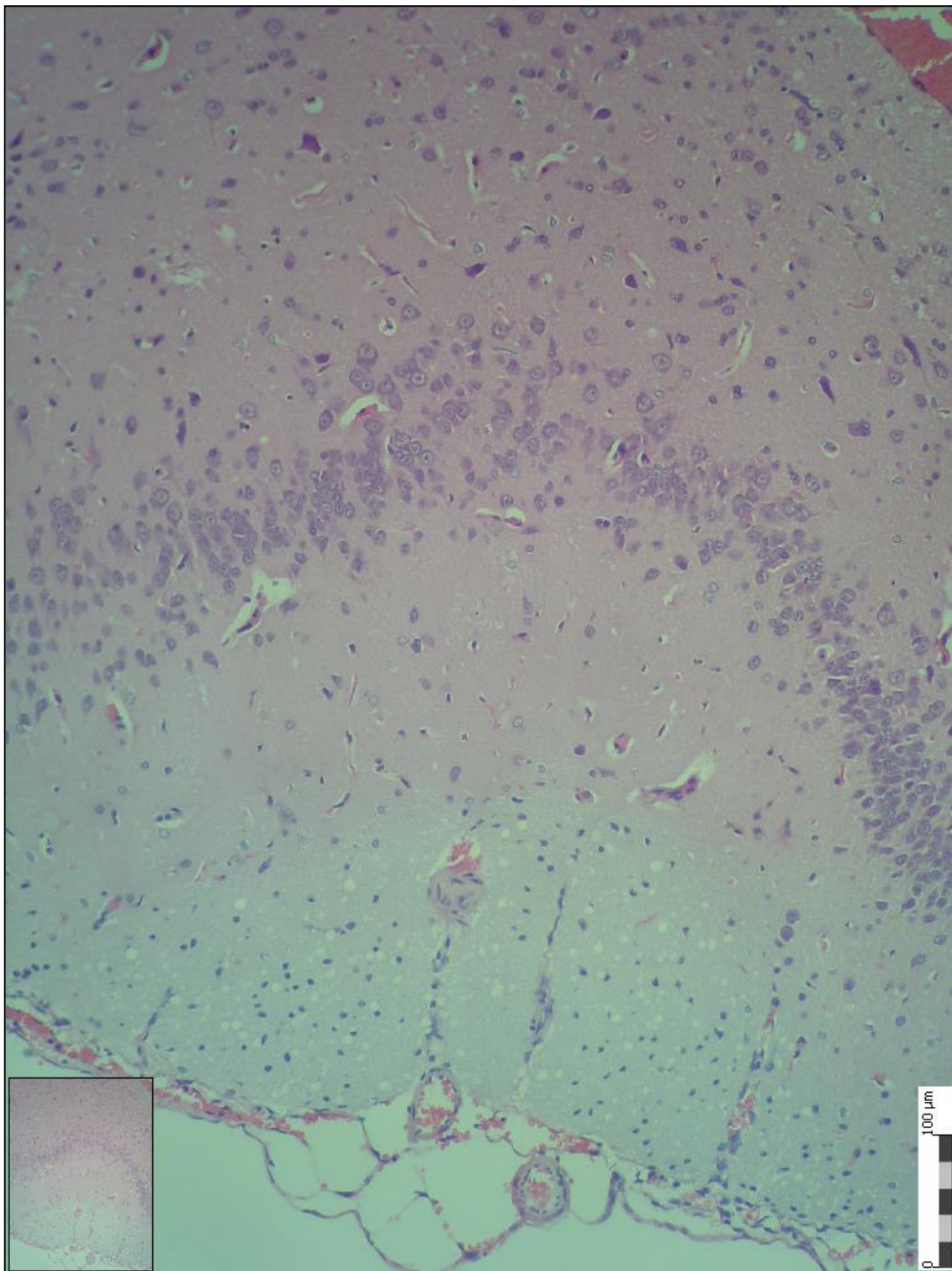


Figura 22: Capa granular de corteza órbitofrontal de *Rattus norvegicus*, GRUPO EXPERIMENTAL B. Coloración Hematoxilina & Eosina, 200 X.

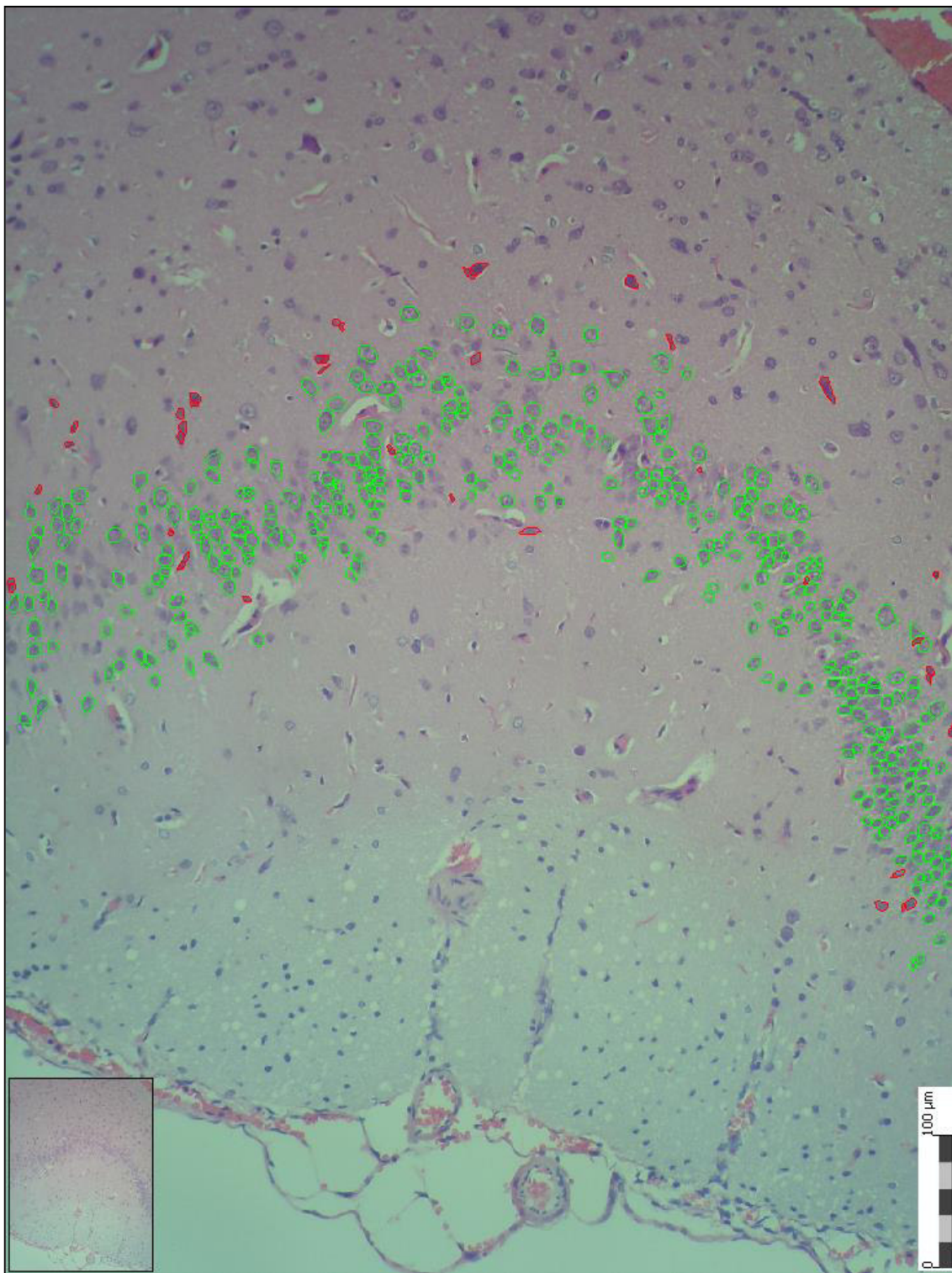


Figura 23: Capa granular de corteza orbitofrontal de *Rattus norvegicus*, GRUPO EXPERIMENTAL B. Coloración Hematoxilina & Eosina, 200 X. Análisis morfométrico JMicrovision v1.25

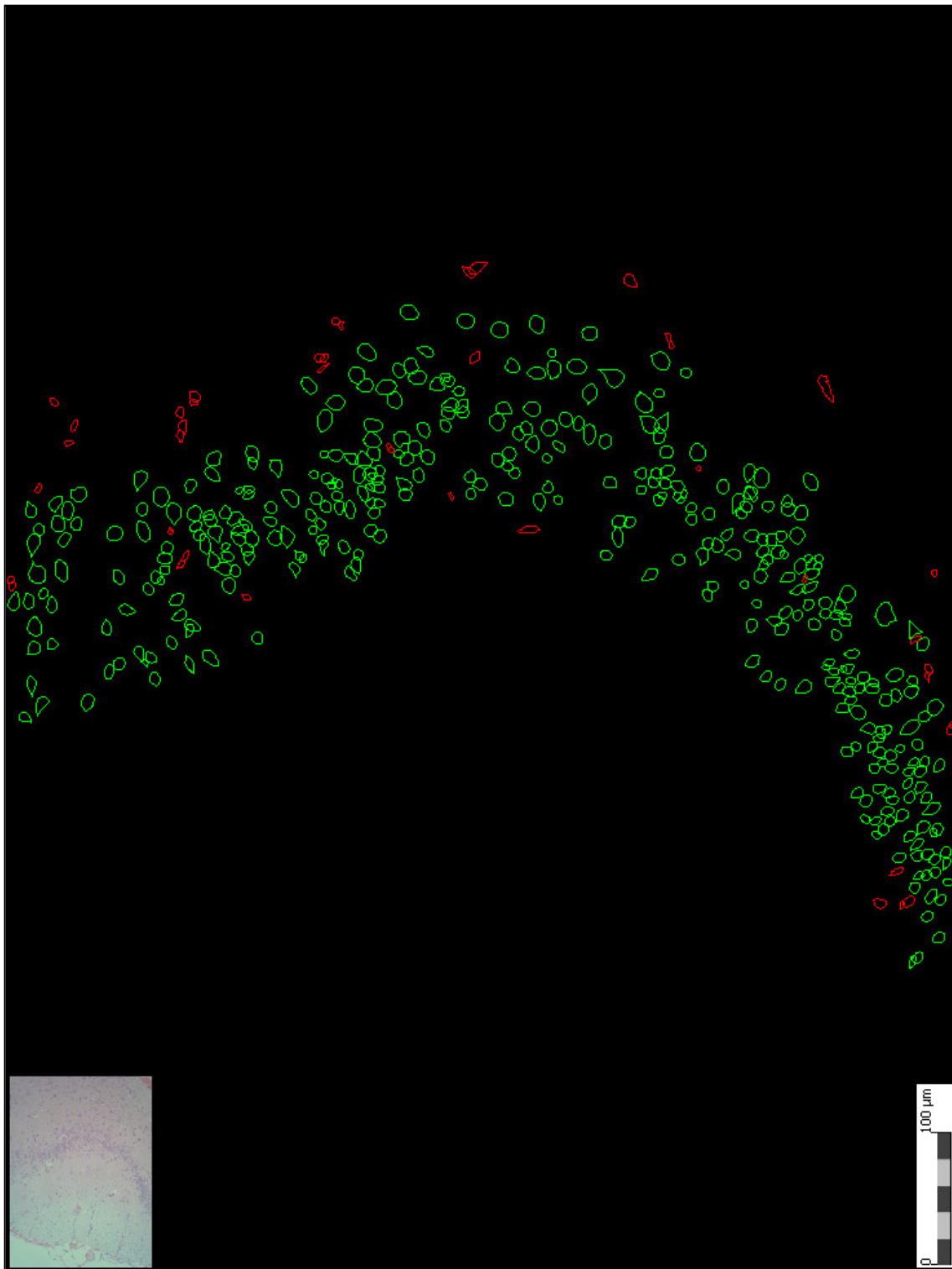


Figura 24: Capa granular de corteza orbitofrontal de *Rattus norvegicus*, GRUPO EXPERIMENTAL B. Coloración Hematoxilina & Eosina, 200 X. Análisis morfométrico JMicrovision v1.25 con sustracción de imagen.

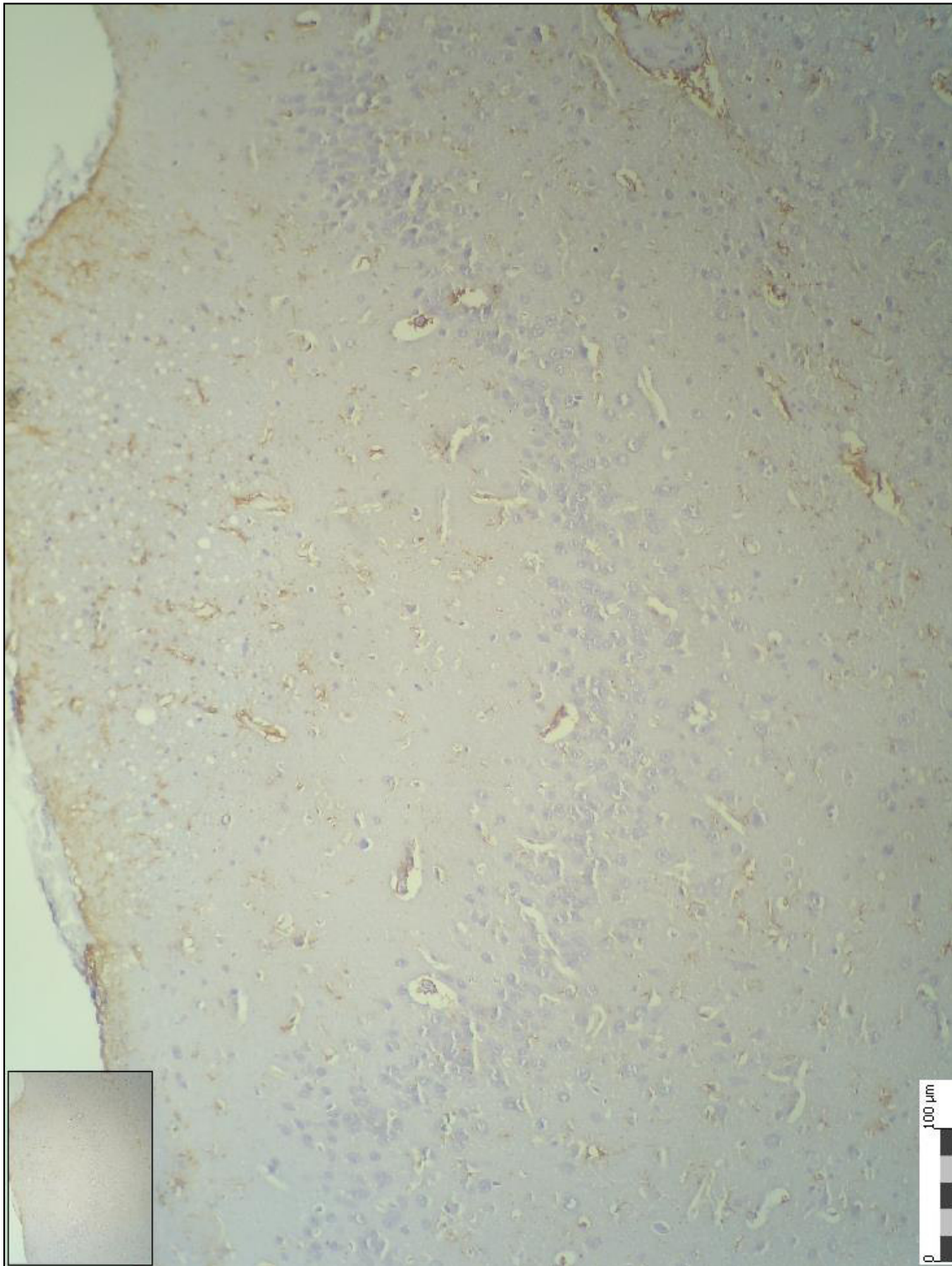


Figura 25: Capa granular de corteza órbitofrontal de *Rattus norvegicus*, GRUPO CONTROL O. Coloración Inmunohistoquímica GFAP, 200 X.

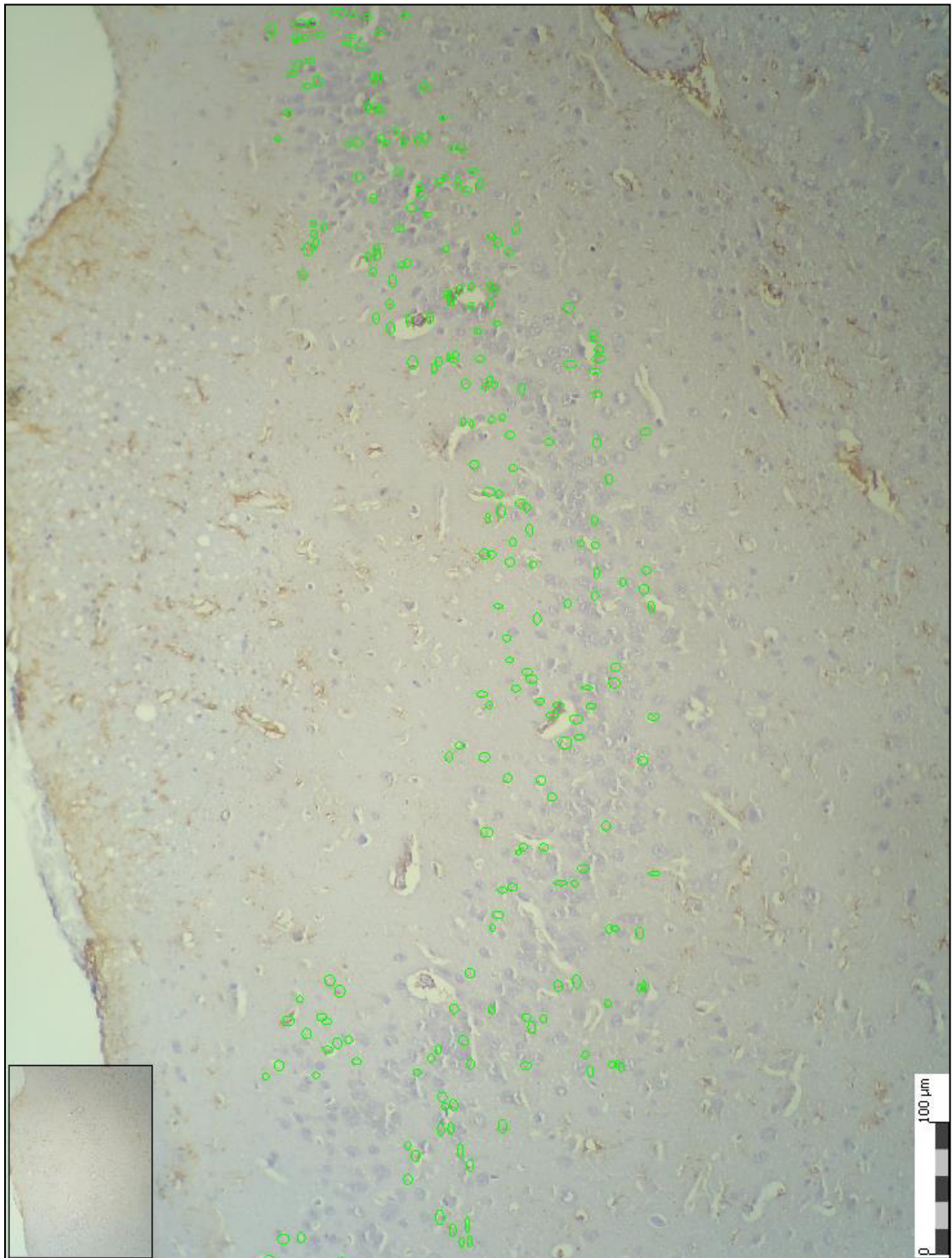


Figura 26: Capa granular de corteza orbitofrontal de *Rattus norvegicus*, GRUPO CONTROL O. Coloración Inmunohistoquímica GFAP, 200 X. Análisis morfométrico JMicrovision v1.25

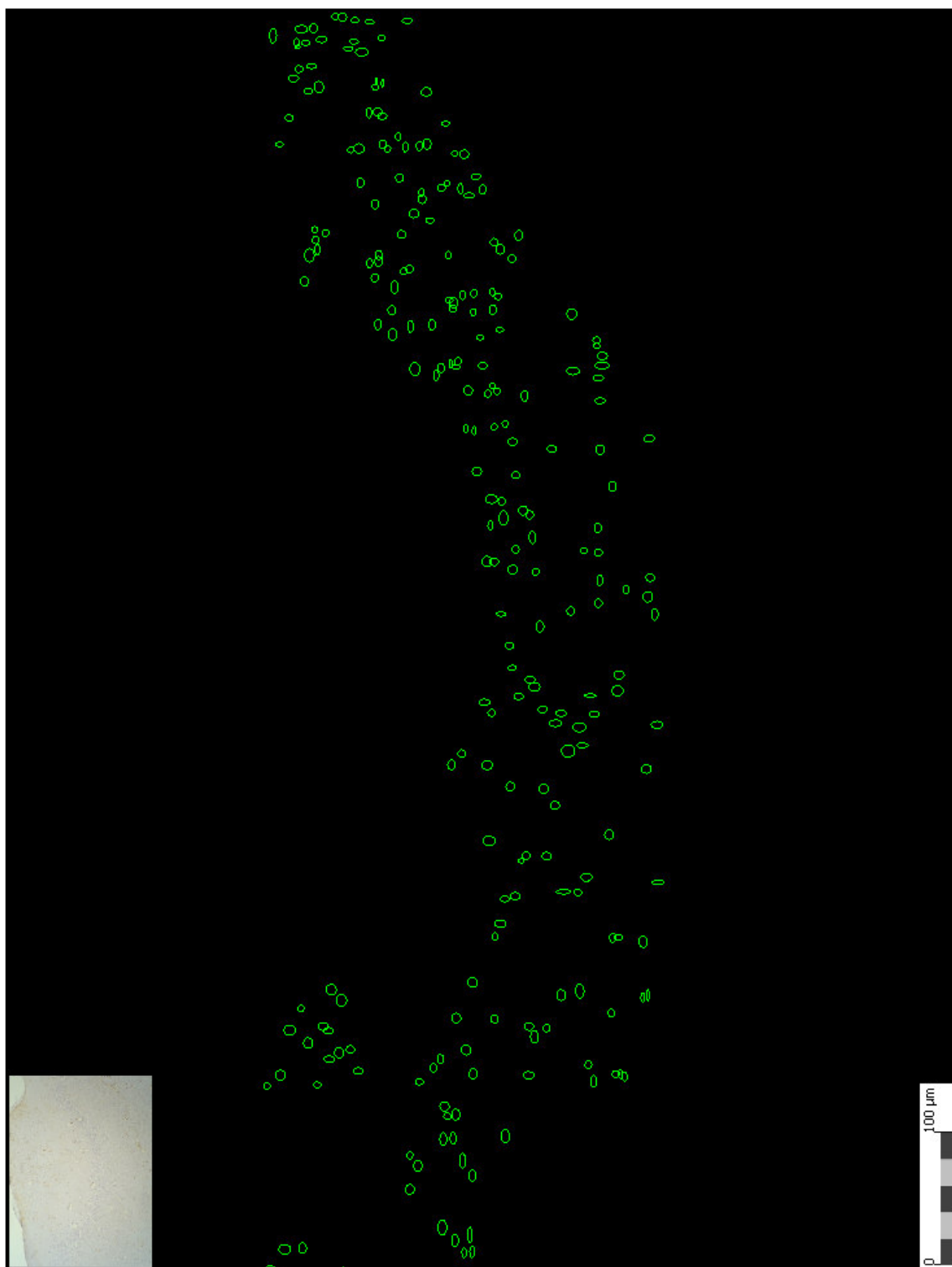


Figura 27: Capa granular de corteza orbitofrontal de *Rattus norvegicus*, GRUPO CONTROL O. Coloración Inmunohistoquímica GFAP, 200 X. Análisis morfométrico JMicrovision v1.25 con sustracción de imagen.

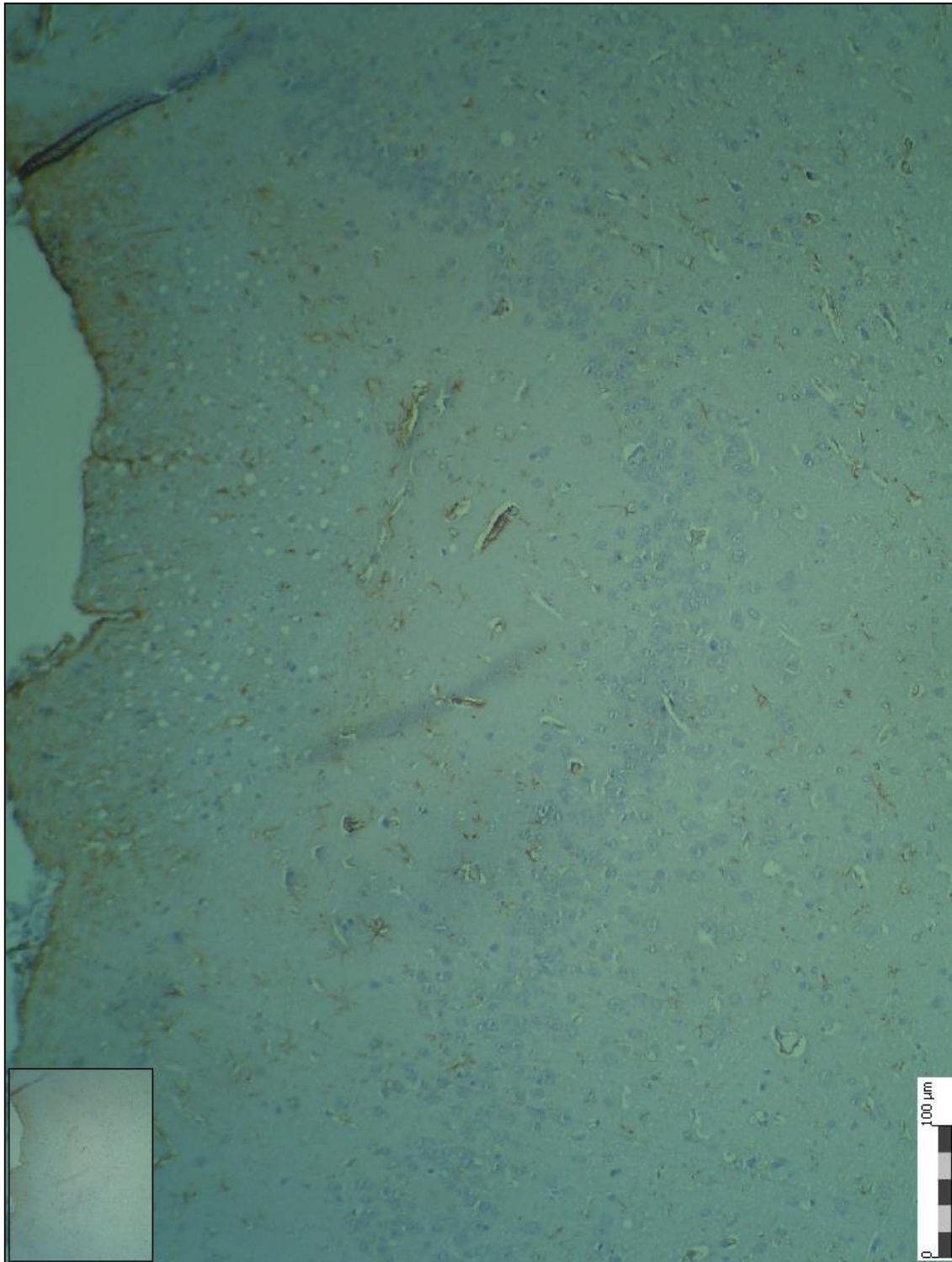


Figura 28: Capa granular de corteza órbitofrontal de *Rattus norvegicus*, GRUPO EXPERIMENTAL A. Coloración Inmunohistoquímica GFAP, 200 X.

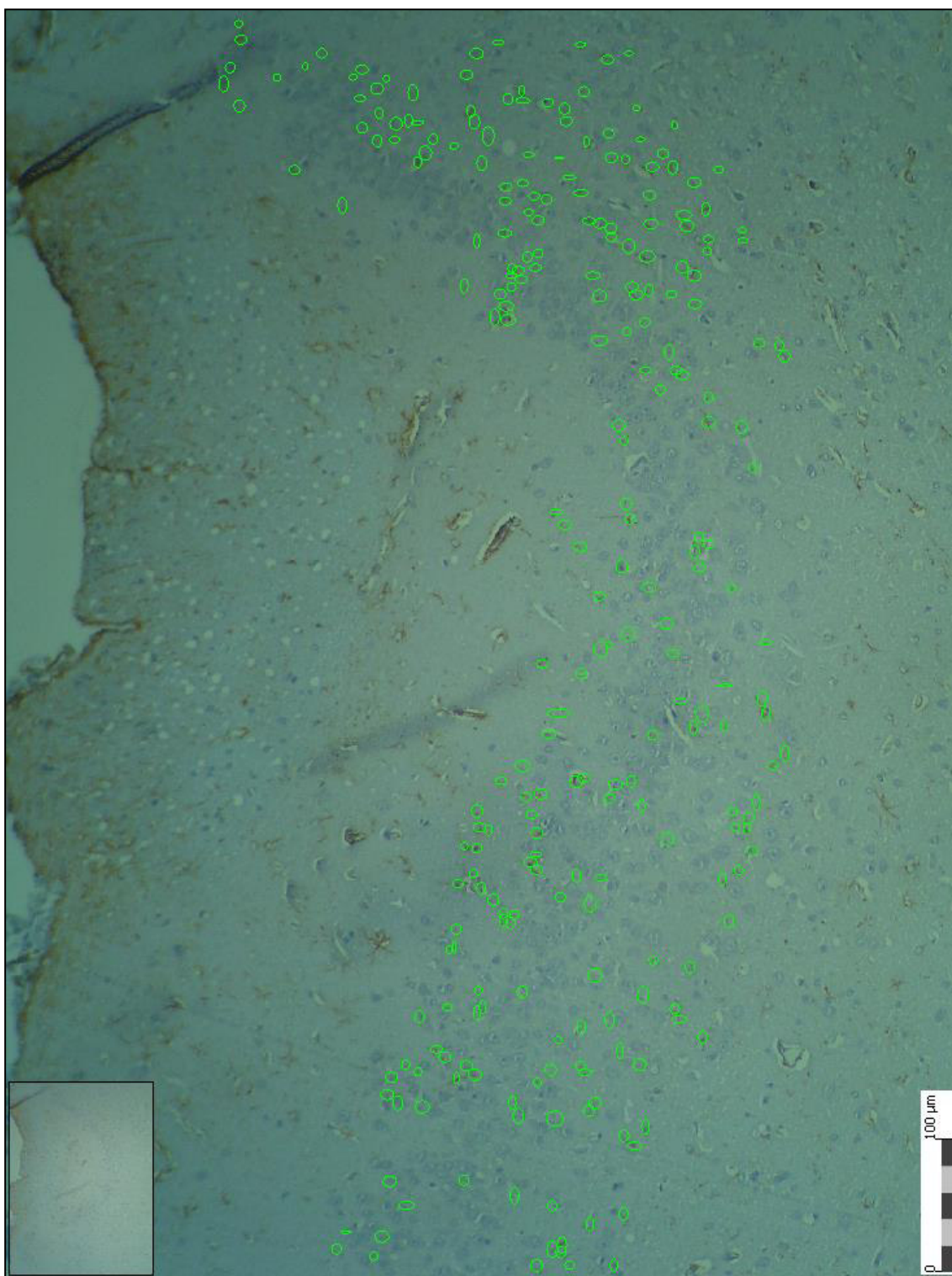


Figura 29: Capa granular de corteza órbitofrontal de *Rattus norvegicus*, GRUPO EXPERIMENTAL A. Coloración Inmunohistoquímica GFAP, 200 X. Análisis morfométrico JMicrovision v1.25

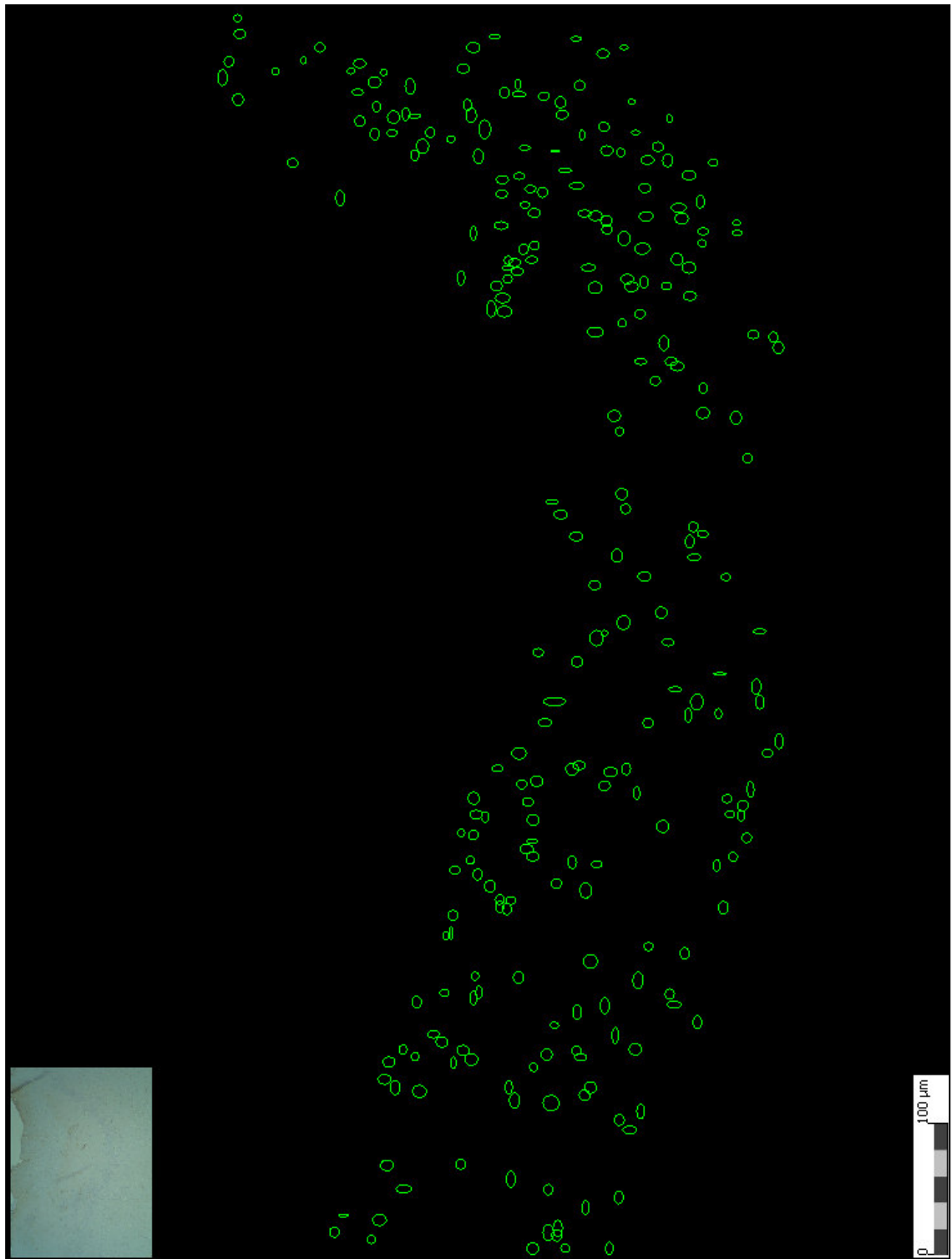


Figura 30: Capa granular de corteza orbitofrontal de *Rattus norvegicus*, GRUPO EXPERIMENTAL A. Coloración Inmunohistoquímica GFAP, 200 X. Análisis morfológico JMicrovision v1.25 con sustracción de imagen.

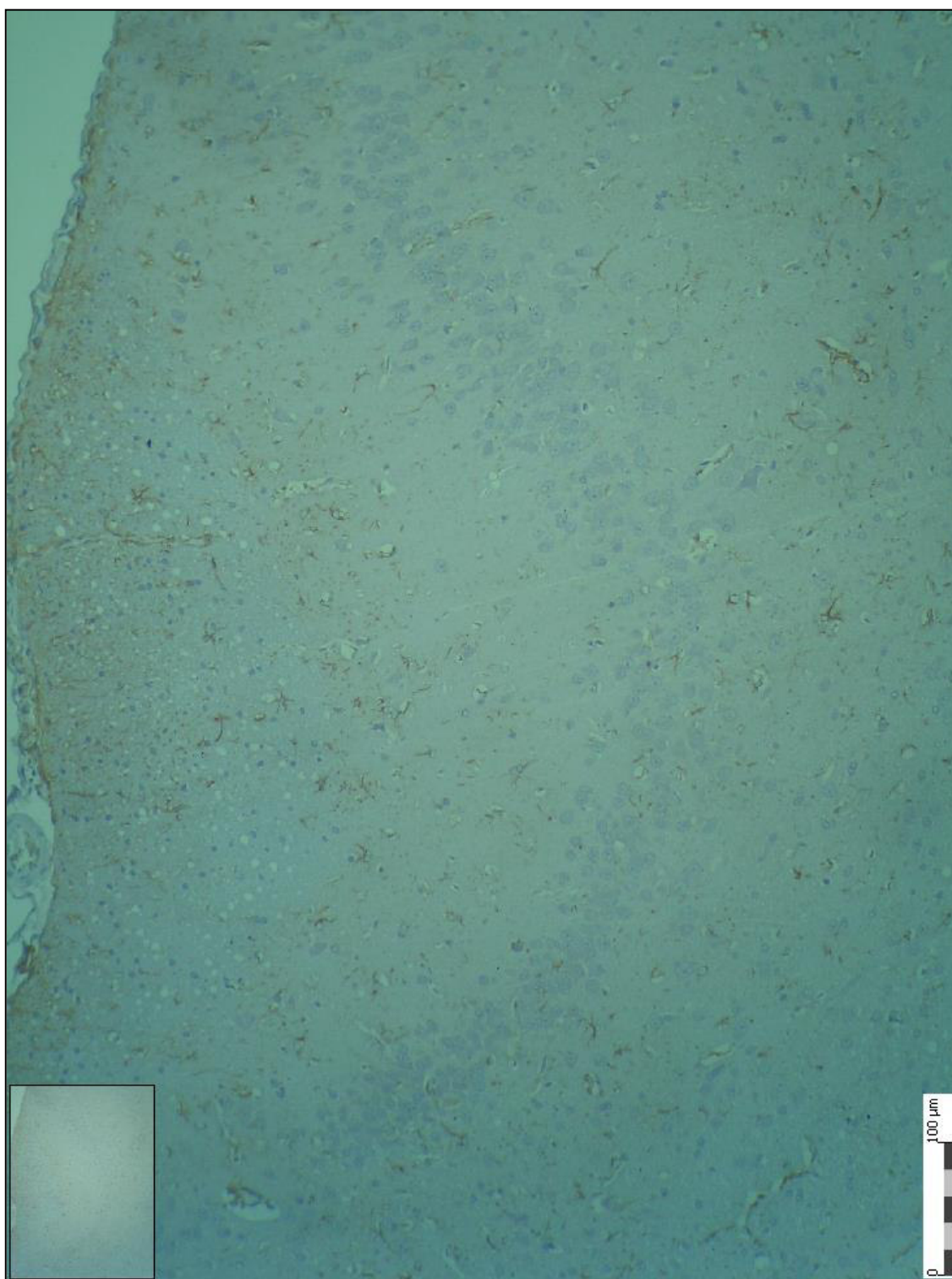


Figura 31: Capa granular de corteza órbitofrontal de *Rattus norvegicus*, GRUPO EXPERIMENTAL B. Coloración Inmunohistoquímica GFAP, 200 X.

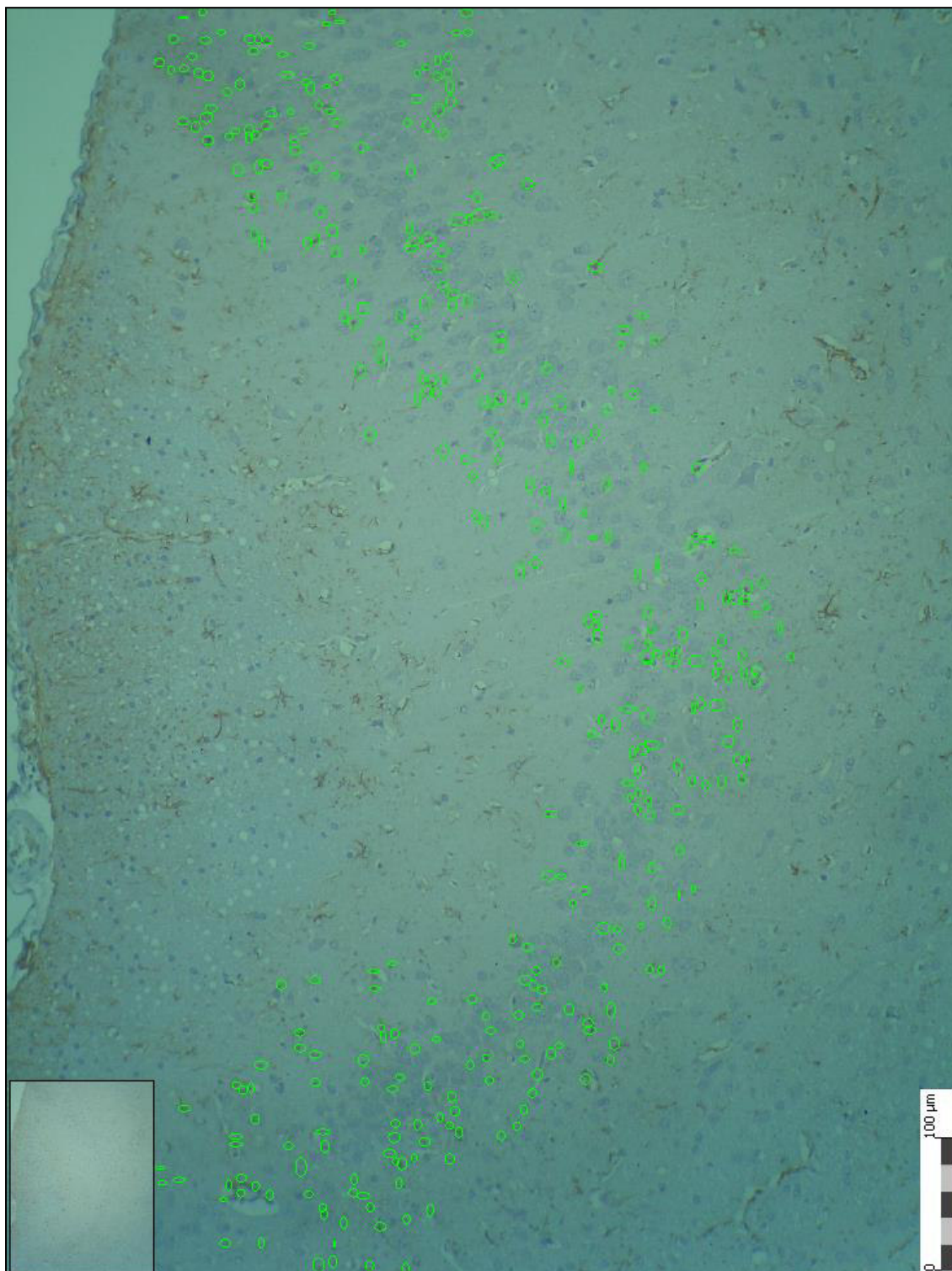


Figura 32: Capa granular de corteza orbitofrontal de *Rattus norvegicus*, GRUPO EXPERIMENTAL B. Coloración Inmunohistoquímica GFAP, 200 X. Análisis morfométrico JMicrovision v1.25

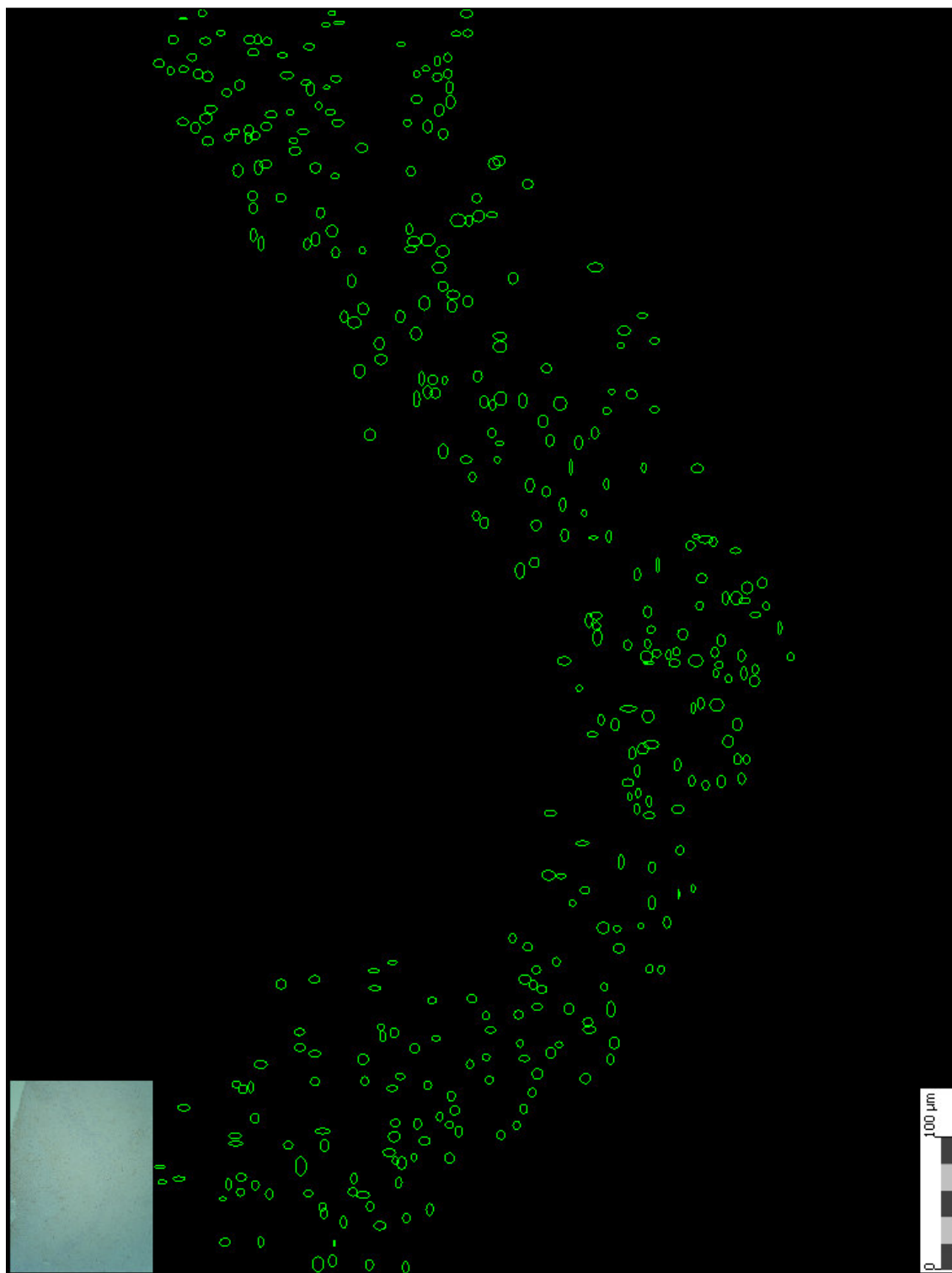


Figura 33: Capa granular de corteza orbitofrontal de *Rattus norvegicus*, GRUPO EXPERIMENTAL B. Coloración Inmunohistoquímica GFAP, 200 X. Análisis morfométrico JMicrovision v1.25 con sustracción de imagen

3.2- DISCUSIÓN

El presente trabajo corrobora la hipótesis que el consumo crónico de bebidas alcohólicas adulteradas produce alteraciones histopatológicas a nivel de la corteza orbitofrontal. Se estudió la capa granular por ser ésta una capa de asociación en la intrincada interconexión existente en la corteza prefrontal, siendo las alteraciones histológicas encontradas la disminución del número de neuronas granulares en las que se encuentra una marcada muerte neuronal seguida de una gliosis de la serie astrocítica. De este modo, la corteza orbitofrontal es la única de las tres partes de la corteza prefrontal humana que también se encuentra en la corteza prefrontal murina, faltando en esta última la corteza dorsolateral y la corteza medial que son dos partes que si las encontramos en humanos.

Al realizar el estudio de la morfometría de las neuronas granulares podemos observar que existe un aumento en la muerte de las mismas las cuales se presentan con una alteración en su forma, dejando de tener la forma fusiforme “en gota” que es característica de esta capa muy desarrollada en la corteza prefrontal murina. Las neuronas granulares necróticas se presentan con una coloración más oscura que el resto perdiendo su forma habitual y la delimitación nuclear, observándose un nucléolo excéntrico que muchas veces llega a desaparecer por completo. Esta pérdida de la forma habitual de la neurona granular es la que se manifiesta en el análisis morfométrico mediante una disminución en el área de las neuronas granulares; existe también una disminución de la superficie de tejido neuronal sin necrosis y aumento de la superficie de tejido neuronal con necrosis.

Con la coloración Argéntica del Río Ortega normalmente se observan astrocitos adheridos a una de las caras de las neuronas granulares a manera de “boina” mientras que en las neuronas necróticas podemos observar la ausencia de la adherencia de dichos astrocitos, los cuales cambian su ubicación por la del neurópilo encontrándose una gran proliferación en esta área.

Al realizar Inmunohistoquímica GFAP para visualizar astrocitos se puede observar que la ubicación predilecta de los mismos es fuera de la capa granular, encontrándose en

mayor cantidad en la capa superior de la corteza orbitofrontal. Pero como el presente trabajo está centrado en el estudio de la capa granular se tuvo que analizar al detalle el número de astrocitos presentes en esta capa; no siempre la inmunohistoquímica con GFAP ayudaba a visualizar claramente el cuerpo astrocitario con todas sus prolongaciones, motivo por el cual se centró nuestra atención en las prolongaciones para poder inferir la ubicación exacta de cuerpo astrocitario. La coloración Argéntica del Río Ortega impregnación triple permitió ubicar el cuerpo astrocitario al igual que sus prolongaciones presentándose siempre los astrocitos bajo la forma de “arañas”, esta coloración presenta del mismo modo a las neuronas granulares y a los astrocitos bajo una silueta muy clara de color negra, pero no ayuda a ver la morfología del núcleo o ubicar de manera exacta el nucléolo.

Mediante la coloración Argéntica del Río Ortega impregnación simple se puede observar claramente la morfología de la neurona granular y diferenciar claramente donde termina el núcleo y donde termina el cuerpo neuronal pero no permite observar prolongaciones neuronales, lo cual si es posible con la coloración Argéntica del Río Ortega impregnación doble o triple. La coloración Hematoxilina & Eosina es útil para hacer un buen conteo de neuronas granulares pero no permite ver a la perfección la morfología de las mismas, mucho menos nos ayuda a ver astrocitos, sólo nos permite observar el núcleo astrocitario y nos ayuda a delimitar donde termina el cuerpo del mismo.

Los licores adulterados son elaborados de manera artesanal y sin seguir ningún control sanitario, en muchos de los casos presentan en su composición alcohol industrial. Se analizaron las cantidades de alcohol etílico en todos los casos y se pudo observar que la cantidad de etanol de los mismos no era muy elevado, sus cantidades fluctuaban entre los 13 y 23 grados, era de esperarse una mayor concentración de alcohol etílico por ser las 3 bebidas estudiadas del orden de los destilados y no de los fermentados.

También se analizaron las cantidades de alcohol metílico de las 3 bebidas alcohólicas adulteradas, encontrándose una gran cantidad de metanol, hasta 10 veces más por encima de la norma establecida. Se piensa que es más peligroso cuando a dichas bebidas se añade un fermentado como lo la cerveza, que si bien presenta metanol

dentro de los estándares permitidos presenta tal vez otros componentes que esta tesis no ha estudiado, o tal vez la poca cantidad de metanol presente en la cerveza potencia la acción del metanol de las mismas; de este modo, mezclar una bebida alcohólica adulterada con cerveza sería más dañino que tomarlas independientemente. Dicha hipótesis fue demostrada en este trabajo, encontrándose que la bebida alcohólica adulterada llamada “Penal” es más dañina que la bebida alcohólica adulterada llamada “Tumbaloco” y esto es debido a que la bebida alcohólica adulterada “Penal” incluye cerveza dentro de sus componentes y por ende más metanol potenciando el daño neuronal.

En este trabajo sólo se examinó la capa granular de la corteza orbitofrontal murina, pero es de inferirse que también existiría daños en otras regiones de la corteza cerebral murina ya que las alteraciones producidas por el alcohol son sistémicas. El primer órgano en alterarse es el cerebro (mucho antes que el hígado u otro órgano) lo cual se sustenta también en observaciones clínicas de cambios de conducta en las personas que ingieren estas bebidas alcohólicas.

Las limitaciones del presente estudio son el empleo de un número relativamente pequeño de animales de experimentación y la ausencia de información disponible respecto del tema de investigación. Si bien es cierto que el número de ratas empleadas fue pequeño (15 por grupo de investigación) es suficiente para la realización del análisis estadístico que permita evaluar el daño en la corteza orbitofrontal por alcoholes adulterados; se requieren estudios adicionales con mayor muestra y que evalúen el daño en otras regiones del sistema nervioso central desde un punto de vista morfométrico y estereológico. Estudios posteriores deberían incluir técnicas de cegado que tienen como finalidad disminuir la subjetividad de los investigadores.

Otra limitación importante es la ausencia de estudios experimentales a nivel nacional e internacional con los cuales comparar los resultados de esta investigación; a pesar de esto, los datos presentados en esta tesis son contundentes al demostrar efectos sobre la corteza orbitofrontal.

3.3- CONCLUSIONES

- El consumo crónico de bebidas alcohólicas adulteradas produce alteraciones histológicas en la corteza prefrontal, a nivel de la capa granular de la corteza orbitofrontal de ratas *Rattus norvegicus*, variedad albina, cepa Sprague Dawley.
- Las alteraciones encontradas en la capa granular de la corteza orbitofrontal fueron la necrosis de las neuronas granulares y un aumento de las glías de la serie astrocítica.
- El daño a nivel de las neuronas granulares y glías de la serie astrocítica son mayores con la ingesta crónica de bebidas alcohólicas adulteradas con cerveza debido a la presencia de etanol y metanol en altas concentraciones al hacer dichas mixturas.
- Los resultados obtenidos en este modelo experimental son extrapolables al ser humano, de este modo los efectos del alcohol sobre la capa granular de la corteza orbitofrontal serían similares.

3.4 – RECOMENDACIONES

- Se recomienda hacer un análisis de todos los componentes presentes en las bebidas alcohólicas adulteradas ya que no sólo contienen etanol y metanol dentro de su composición, eso ayudará a comprender mejor los daños que produce su consumo.
- El presente estudio ha sido realizado a dosis plena de alcohol; por esta razón es necesario realizar también estudios a dosis menores de bebidas alcohólicas adulteradas con la finalidad de determinar su efecto crónico sobre la capa granular de la corteza orbitofrontal.
- Se recomienda realizar un estudio estereológico de la capa granular orbitofrontal murina, con estudios de densidad neuronal y número de neuronas por μm^3 .
- Se recomienda realizar estudios conductuales a las ratas de experimentación para poder correlacionar sus alteraciones con las alteraciones histopatológicas producidas por el consumo crónico de las bebidas alcohólicas adulteradas al demostrarse la utilidad de este modelo experimental.

Capítulo 4

Referencias Bibliográficas

4.1 – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Iruarrizaga M. Alteraciones neuropsicológicas en el alcoholismo y la politoxicomanía. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, 2003.
2. Miraval E. Farmacodependencia y alcoholismo. Lima: Impresiones Horizonte, 2003.
3. Aragón C, Miquel M, Correa M, Sanchis-Segura C. Alcohol y metabolismo Humano. Adicciones 2002; 14 (1): 23-38.
4. Grekin E. The relationship between familial risk for alcoholism, frontal lobe dysfunction and aggression. Clinical Psychology 2004; 64 (11): 5783–5863.
5. Brun A. Frontal dysfunction and frontal corticil synapse loss in alcoholism the main cause of alcohol dementia. Dementia and Geriatric Cognitive Disorders 2001; 12 (4): 289-294.
6. Graham D. Celular pathology of the central nervous system IN: Kreutzberg G, Blakemore W, Grawrr M. Greenfield's Neuropathology 6th edition. New York: Arnold; 1997: 85-140 pag.
7. Zarranz J, La membrana neuronal IN: Jiménez C. Membrana neuronal y patología cerebral. Barcelona: Edipharma; 2000: 21–28 pag.
8. Martínez A, Rábano A. Efectos del alcohol étílico sobre el sistema nervioso. Rev Esp Patol 2002; 35 (1): 63–76.

9. Calderón-Guzmán T, Hernández-Islas D, Hernández-García J. La *Rattus norvegicus* como modelo experimental en neurociencias. Arch Neurocién Mex 2002; 7(1): 51-57.
10. Rodrigues M, Alfred E, Pereira F, Bahamad F, Oliveira R. Estudo estereológico das células de purkinge cerebelares submetidas à intoxicação alcoólica em ratas wistar. Arq Neuropsiquiatr 2003; 60 (2): 258-263.
11. Isao A, Artiole S, Aporecida E, Helena C, Lurann S, et al. Morphometric and ultrastructural analysis of the optic nerve in rats following induced ethanol consumption. Arq Bras Oftalmol 2003; 66 (3): 321–324.
12. Pereira M, Molinari S, De Sousa F. Density and morphometry of myenteric neurons of the ileum of rats subjected to chronic alcoholism. Int J Morphol 2003; 21 (3): 245–250.
13. Qu W, Wu D. Effects of alcohol and metabolite acetaldehyde on the proliferation of astroglial cells of fetal brain. Wei Sleng Yan Jiu 1999; 28 (4): 206–207.
14. Agar E, Demir S, Arnonvermez R, Bosnok M, Ayyildiz M, et al. The effects of ethanol consumption on the lipid peroxidation and glutathione levels in the right and left brains of rats. Int Jneurosci 2003; 113 (12): 1643–1652.
15. Castillo P, Rodrigo L, Carrasco L, Rodrigo A, House M, et al. Efecto antagónico del consumo crónico de vino tinto y etanol sobre la actividad de la ($\text{Na}^+ \text{K}^+$) ATPasa renal. Med UNAB 2003; 6 (16): 10–14.
16. Díaz R, Pérez M, Pichardo L, Peláez J, Payano J, et al. Histopatología del sistema nervioso central murino tras la administración de bebidas alcohólicas adulteradas. Lima: Biblioteca de Patología Experimental UNMSM, 1999.
17. Piño E, Gutiérrez Salinas J, Morales–González J, Zentella M. ¿Es tóxico el alcohol? Mensaje Bioquímico 2003; 27: 121–140.

Capítulo 5

Anexos

FÓRMULAS

GRAMOS DE ETANOL:

$$gOH = \frac{(VOL \text{ ml}) (X\%) (\delta)}{100}$$

GRAMOS DE ETANOL POR Kg DE PESO HUMANO:

$$gOH / Kg \text{ peso humano} = \frac{(VOL \text{ ml}) (X\%) (\delta)}{100} \cdot \frac{(1)}{(70)}$$

GRAMOS DE ETANOL POR Kg DE PESO MURINO:

$$gOH / Kg \text{ peso murino} = \frac{(VOL \text{ ml}) (X\%) (\delta)}{100} \cdot \frac{(1)}{(70)} \cdot (4)$$

BEBIDAS ALCOHÓLICAS ADULTERADAS

A. TUMBALOCO = **PISCO + ANISADO + COGNAC**
(16.976666 %) **(166.66 ml)(166.66 ml) (166.66 ml)**

B. PENAL = **PISCO + ANISADO + COGNAC + CERVEZA**
(13.9825 %) **(125 ml) (125 ml) (125 ml) (125 ml)**

E. ETANOL = **ETANOL 99.7% + H₂O DESTILADA**
(15 %) **(75.225677 ml) (424.77433 ml)**

DOSIS

VOLUMEN:

$$\text{VOL ml} = \frac{\text{VOL BEBIDA ml}}{3} \cdot (1) \cdot (4) \cdot \frac{\text{PESO MURINO g}}{(70)} \cdot (1000)$$

SIENDO: VOL = 750 ml (1 Botella)

gOH / kg murino PENAL	= 4.7196922
gOH / kg murino TUMBALOCO	= 5.7303513
gOH / kg murino ETANOL	= 5.0631420

TOMAMOS: gOH / kg murino ETANOL = 5.0631420

VOL PENAL	= 804.577 ml
VOL TUMBALOCO	= 662.67416 ml
VOL ETANOL	= 750 ml

DOSIS

(Usando constantes)

VOL ml PENAL = (0.0153252) (Peso murino g)

VOL ml TUMBALOCO = (0.0126223) (Peso murino g)

VOL ml ETANOL = (0.0142857) (Peso murino g)



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA
CICOTOX**

CENTRO DE INFORMACIÓN, CONTROL TOXICOLÓGICO Y
APOYO A LA GESTIÓN AMBIENTAL
RR 00025-CR-99



ANÁLISIS TOXICOLÓGICO

№ 030443

Solicitante: RAFAEL DÍAZ RUDAS Institución: FACULT. DE MEDICINA UNAMSH.
Paciente: Edad:
Muestra: Amisado - 3 Fecha: 02/11/04 Hora: 5:17 pm.

PROTOCOLO DE ANÁLISIS

I. INVESTIGACIÓN TOXICOLÓGICA

- Alcohol etílico
- Alcohol metílico
- Cocaína
- Anfetaminas
- Barbitúricos
- Benzodiacepinas
- Estrignina
- Benceno y derivados
- Fenotiazinas
- Marihuana
- Tolueno
- Plaguicidas:
 - a) Bupiridilos
 - b) Cumarinas
 - c) Carbamatos
 - d) Organofosforados
 - e) Piretroides
- Colinesterasa sérica

[illegible]

Metales

- a) Arsénico
- b) Manganeseo
- c) Sodio
- d) Calcio
- e) Cobre
- f) Fierro
- g) Mercurio
- h) Plomo
- i) Magnesio
- j) Zinc
- K) Potasio

Otras Determinaciones

II. RESULTADOS $[ALCOHOL\ ETILICO] = 141,6\text{ g/L} = 14,16\%$

ANALISTA
JAIR LOZANO RUBIO



Integral
DIRECTOR (A)
JOSE ALFONSO APESTECUA INFANTES
Químico - Farmacéutico
Tl. (511) 328-7398
C.F.P. 6538

Sede: Jr. Puno 1002 Jardín Botánico - Aptdo. 1760, Lima 1 Tf. (511) 328-7398

0800-113040 cicotok@hotmail.com

Atención: Lun. - Dom. las 24 horas los 365 días del año

Recoge el resultado: Nombre Luz Bocanegra Dávila

Fecha: 29-11-04



ANÁLISIS TOXICOLÓGICO

No 030440

Solicitante: RAFAEL DÍAZ Roldo Institución: FACULT. de Medicina UNMSM.
Paciente: Edad:
Muestra: ANISADO LL Fecha: 02/11/04 Hora: 5:17 pm.

PROTOCOLO DE ANÁLISIS

I. INVESTIGACIÓN TOXICOLÓGICA

- Alcohol etílico
- Alcohol metílico
- Cocaína
- Anfetaminas
- Barbitúricos
- Benzodiacepinas
- Estrignina
- Benceno y derivados
- Fenotiazinas
- Marihuana
- Tolueno
- Plaguicidas:
 - a) Bipirílicos
 - b) Cumarinas
 - c) Carbamatos
 - d) Organofosforados
 - e) Piretroides
- Colinesterasa sérica

[illegible]

Metales

- a) Arsénico
- b) Manganeseo
- c) Sodio
- d) Calcio
- e) Cobre
- f) Fierro
- g) Mercurio
- h) Plomo
- i) Magnesio
- j) Zinc
- K) Potasio

[illegible]

Otras Determinaciones

II. RESULTADOS $[\text{ALCOHOL METILICO}] = 19,67 \text{ g/L} = 1,96 \%$

ANALISTA
CARLOS HUAMANI PACSI
Químico Farmacéutico
C.O.F.P. 07911



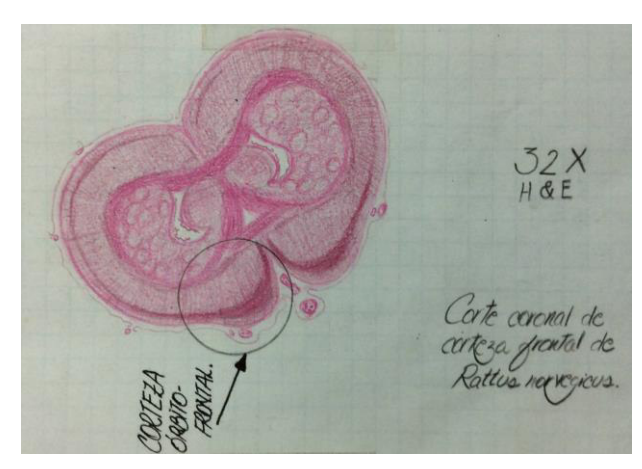
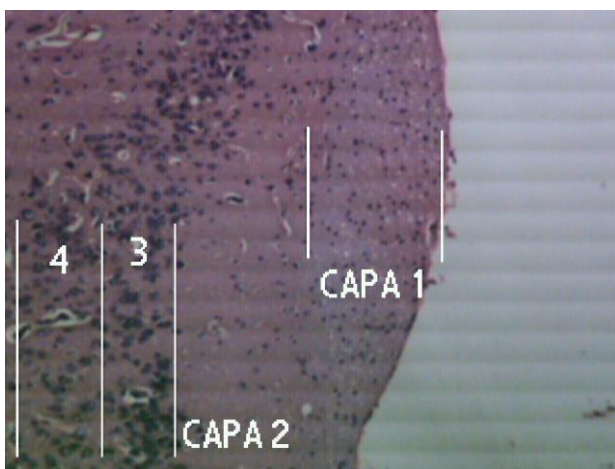
~~DIRECTOR (A~~

JOSE ALFONSO APUESTEGUIA INFANTES
Químico - Farmacéutico
C.O.F.P. 6538

Unio 1002 Jardín Botánico- Aptdo. 1760, Lima 1 Tf. (511) 328-7398
0800- 3-3040 cicofox@hotmail.com
Atención: Lun.- Dom.- las 24 horas los 365 días del año

Recoge el resultado: Nombre Lupe Bocanegra Dávila

Fecha: 29-11-04





“Los médicos administran medicamentos que conocen poco, a enfermos que conocen menos, para curar enfermedades que nada conocen”

Voltaire